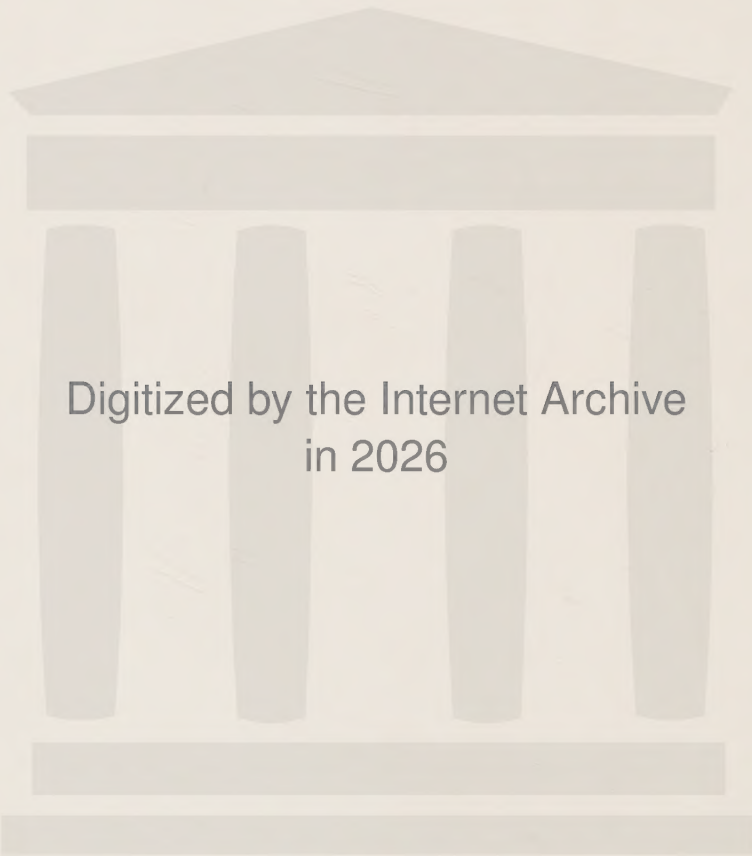


**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
DER BROMCYANPEPTIDE
DES SEEANEMONENKOLLAGENS**

Hans Nowack

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554601_0018

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
DER BROMCYANPEPTIDE
DES SEEANEMONENKOLLAGENS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Hans Nowack

aus

Görlitz

M ü n c h e n 1 9 7 3



1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin
Tag der mündlichen Prüfung: 7.5.1973

MEINEN ELTERN

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut
für Eiweiß- und Lederforschung in München in der
Zeit von Oktober 1969 bis August 1972 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Klaus Kühn
und
Herrn Professor Dr. Theodor Severin

danke ich herzlich für das erwiesene Entgegenkommen
und die guten Arbeitsbedingungen.

Herrn Dr. Arnold Nordwig

gilt in besonderem Maße mein Dank für die Unter-
stützung und Förderung der Arbeit.

Frau H. Kadner und Fräulein I. Menge habe ich für
ihre technische Assistenz sehr zu danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG	1
Das Kollagenmolekül	
Beiträge zur Evolution des Kollagens	
AUFGABENSTELLUNG	7
ERGEBNISSE	
I. Wahl des Ausgangsmaterials für die CNBr-Spaltung	8
1. Actinocol (SLK): Versuche zur Ausbeuteerhöhung	8
2. Actinocol (PLK): CNBr-Spaltung nach Denaturierung und Versuche einer Auftrennung der Peptide	11
II. Darstellung und Charakterisierung von Actinocol- α (PLK)	13
1. Molekularsiebchromatographie von nicht reduzierten Actinocol (PLK) an Bio-Gel A-1.5 m	15
2. Reduktion von Actinocol (PLK) mit Natriumborhydrid	15
3. Isolierung von reduziertem Actinocol- α (PLK) am Molekularsieb	16
4. Prüfung auf Einheitlichkeit der α -Fraktion	
a) CM-Cellulosechromatographie	17
b) SDS-Disk-Elektrophorese	18
5. Molekulargewichtsbestimmung am Molekularsieb	19
6. Aminosäureanalyse	21
III. Isolierung und Charakterisierung der CNBr-Peptide von Actinocol- α (PLK)	
1. Nomenklatur	21
2. CNBr-Spaltung von Actinocol- α (PLK)	21
3. Vortrennung der Peptide durch Molekularsiebchromatographie	22

4. Reindarstellung der Peptide	24
a) CB1 und CB3-4	24
b) CB2 und CB6-7	30
c) CB3, CB4, CB5, CB6 und CB5-10	32
d) CB7, CB8, CB9	38
e) CB10	42
f) CB11	43
5. Versuch zur Auftrennung der Fraktion I	44
6. Aminosäureanalyse	45
7. Molekulargewichtsbestimmung	47
8. Doppelpeptide	50
9. Stöchiometrie	52
10. Kohlenhydratgehalt	55
11. Untersuchung am Elektronenmikroskop	57
IV. Immunologie der CNBr-Peptide	58
1. Lokalisierung der Determinante	59
2. Tryptische Spaltung von CB6-7 und Isolierung des serologisch aktiven Peptids	62
3. Charakterisierung des serologisch aktiven Peptids T _{CB6-7}	64
DISKUSSION	
1. Drei identische α -Ketten?	66
2. Vergleich mit anderen Kollagenarten	68
3. Kohlenhydratverteilung und mögliche Funktion	74
4. Immunologie des Actinocols	76

EXPERIMENTELLER TEIL

Versuch 1	Präparation von Actinocol (PLK)	77
Versuch 2	Reduktion des Actinocols (PLK) mit Natriumborhydrid	78
Versuch 3	Vorbereitung für die Chromatographie und Rechromatographie von reduziertem Actinocol (PLK) an Bio-Gel A-1.5 m	79
Versuch 4	CNBr-Spaltung	79
	4.1. in Ameisensäure	
	4.2. in Salzsäure	
	4.3. in Harnstoff	
Versuch 5	Trypsinspaltung von CB6-7	80
Versuch 6	Ionenaustauscherchromatographie	
	6.1. CM-Cellulosechromatographie	81
	6.1.1. Homogenitäts- bzw. Heterogenitätsprüfung von Actinocol- α (PLK)	81
	6.1.2. Trennung der CNBr-Peptide von Actinocol (PLK)	82
	6.1.3. Trennung der CNBr-Peptide von Actinocol- α (PLK)	82
	6.2. Phosphorcellulosechromatographie	83
Versuch 7	Gelchromatographie	
	7.1. Bio-Gel P-2	83
	7.1.1. Äquilibrieren für die Ionenaustauscherchromatographie	84
	7.1.2. Entsalzen	84
	7.2. Bio-Gel P-4	84
	7.3. Bio-Gel P-10	84
	7.4. Bio-Gel P-150	85
	7.5. Bio-Gel A-1.5 m	85

Versuch 8	Molekulargewichtsbestimmung am Molekularsieb	86
Versuch 9	Hydroxyprolinbestimmung	86
Versuch 10	Stickstoffbestimmung	86
Versuch 11	Hydrolysebedingungen für die quantitative Aminosäureanalyse	86
Versuch 12	Alkalische Hydrolyse zur quantitativen Bestimmung von Glc-Gal-Hyl, Gal-Hyl und freiem Hyl	87
Versuch 13	Bedingungen für den Aminosäureanalysator	88
Versuch 14	SDS-Disk-Elektrophorese	89
Versuch 15	Renaturierung und Elektronenmikroskopie	92
Versuch 16	Bereitung der Antiseren	93
Versuch 17	Passive Hämagglutination	93
	17.1. Agglutinationstest	94
	17.2. Inhibitionstest	94
	ZUSAMMENFASSUNG	95
	LITERATURVERZEICHNIS	97
	LEBENS LAUF	101

Abkürzungen

AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAPN	β -Aminopropionitril
CM-	Carboxymethyl-
E	Extinktion
EM	Elektronenmikroskop
Gal	Galactose
Glc	Glucose
m	molar
n	normal
PC	Phosphorcellulose
PLK	Pepsinlösliches Kollagen
SDS	Dodecylsulfat, Na-Salz
SLK	Säurelösliches Kollagen
SLS	Long-Spacing-Segment(e)
T _M	Schmelzpunkt
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Erläuterungen zur Nomenklatur:

Actinocol	Kollagen der Seeanemone Actinia equina L.
Actinocol- α	α -Fraktion bzw. α -Kette des Seeanemonenkollagens
Actinocol (PLK)	Seeanemonenkollagen, das mittels Pepsin in Lösung gebracht wurde
Actinocol (SLK)	Säurelösliches Seeanemonenkollagen
Kollagen A	Aus Haut, Sehnen oder Knochen von Vertebraten isoliertes Kollagen der Struktur $(\alpha_1)_2\alpha_2$
Kollagen C	Aus Knorpel von Vertebraten isoliertes Kollagen der Struktur $(\alpha)_3$
Kollagen S	Aus fötaler Haut von Vertebraten iso- liertes Kollagen der Struktur $(\alpha)_3$

E I N L E I T U N G

Das Kollagenmolekül

Kollagen ist ein Faserprotein. Sein Molekül hat im nativen Zustand die Form eines steifen Stäbchens mit einer Länge von ungefähr 2900 Å und einem Durchmesser von 14.5 Å. Dieses Stäbchen wird aus drei Polypeptidketten, α -Ketten genannt, gebildet, von denen jede etwa 1000 Aminosäuren enthält. Jede α -Kette bildet eine linksgewundene Einzelhelix (Sekundärstruktur); zudem sind diese drei Ketten um eine gemeinsame Achse zu einer rechtsgängigen Überhelix verdreht (Tertiärstruktur), die durch Wasserstoffbrücken verfestigt ist (Rich und Crick, 1955 und 1961; Ramachandran und Kartha, 1955; Yonath und Traub, 1969). Zur Ausbildung dieser Kollagen-Tripelhelix ist Voraussetzung, daß jede dritte Aminosäure Glycin ist, und zwar aus Raumerfüllungsgründen.

Die α -Ketten, bzw. deren Vorstufen, werden an den Polyribosomen der Fibroblasten synthetisiert. (Eine Hydroxylierung des Prolins und Lysins mittels der Enzyme Prolin- bzw. Lysinhydroxylase erfolgt erst an der synthetisierten Kette). Die aus den Ketten gebildeten Moleküle werden anschließend in den extrazellulären Raum abgegeben, wo sie sich unter Viertelversetzung zu Fibrillen zusammenlagern (vgl. Grant und Prockop, 1972). Durch Quervernetzung gehen die Fibrillen langsam vom löslichen in den unlöslichen Zustand über.

Für diese Quervernetzung sind bestimmte Lysin- bzw. Hydroxylysinreste, möglicherweise unter Beteiligung von Histidinresten (Fairweather et al., 1972), verantwortlich. Der erste Schritt bei der Quervernetzung besteht in der oxydativen Desaminierung der Lysin- bzw. Hydroxylysinreste im Kollagen zu Lysin- bzw. Hydroxylylsinaldehyden.

Diese Aldehyde können entweder mit den ϵ -Aminogruppen von Lysin- oder Hydroxylysinresten anderer α -Ketten eine kovalente Bindung nach Art einer Schiff'schen Base eingehen oder

mit einer zweiten Aldehydgruppe benachbarter α -Ketten ein Aldolkondensationsprodukt bilden. Da die Aldehyd- und Amino-
gruppen entweder von Lysin- oder Hydroxylysinresten gestellt
werden, sind theoretisch vier verschiedene Schiff'sche Basen
und vier verschiedene Aldolkondensationsprodukte zu erwarten.
Bis jetzt wurden fünf oder sechs von diesen theoretisch mög-
lichen Formen im Kollagen gefunden (Bailey et al., 1970;
Mechanic und Tanzer, 1970).

Wie wichtig die Quervernetzungen für die Funktionsfähigkeit
des Bindegewebes sind, zeigt der experimentell erzeugbare
Lathyrismus. Hierbei werden jungen Tieren lathyrogene Sub-
stanzen, das sind substituierte Alkylcyanide, wie etwa β -Amino-
propionitril (BAPN) verabreicht. Nach kurzer Zeit der Behand-
lung (etwa 2-3 Wochen) ist eine Deformation der Wirbelsäule,
eine Demineralisierung der Knochen, eine Neigung zu Gelenks-
luxationen und ein gelatineähnliches Aussehen des Bindegewebes
zu beobachten. Die Löslichkeit des homogenisierten Gewebes
in kalten neutralen sowie sauren Puffern steigt auf das 5-10-
fache, verglichen mit dem Gewebe unbehandelter Kontrolltiere.
Die Ursache für diese Veränderungen liegt in der Inhibition
des für die Oxydation am ϵ -C-Atom des Lysin- bzw. Hydroxy-
lysinrestes verantwortlichen Enzyms (Aminoxydase). Als Folge
davon stehen keine quervernetzungsbereiten Aldehyde zur Ver-
fügung (vgl. Piez, 1968a).

Ähnlich in der Wirkung wie BAPN ist Penicillamin. Allerdings
liegt hier ein anderer, Quervernetzungen verhindernder Mecha-
nismus zugrunde. Penicillamin inhibiert nicht die Aminoxydase,
sondern blockiert stattdessen die von der Aminoxydase ge-
bildeten Aldehyde (Deshmukh und Nimni, 1969).

Hydroxylysin hat im Kollagen eine weitere wichtige Funktion
zu erfüllen. Es ist alleiniger Akzeptor für die durch Enzyme
übertragenen Galactosyl- bzw. Glucosyl-Galactosylreste, die
fast ausschließlich den kovalent gebundenen Kohlenhydratan-
teil des Kollagens ausmachen (Spiro und Spiro, 1971a, 1971b
und 1971 c). Der Galactosyl- bzw. Glucosyl-Galactosylrest

liegt β -glykosydisch an die Hydroxylysingruppe gebunden vor (vgl. Spiro, 1970).

Über die Funktion der an Hydroxylysin gebundenen Kohlenhydrate gibt es noch keine gesicherten Vorstellungen. An anderer Stelle wird darauf näher eingegangen werden.

Man unterscheidet zwischen verschiedenen Kollagentypen. Allen gemeinsam ist der Aufbau aus drei α -Ketten. Im Bereich der Vertebraten findet man vorherrschend die Struktur $(\alpha 1)_2\alpha 2$, d.h. ein aus zwei identischen α -Ketten, genannt $\alpha 1$, und eine in Bezug auf die Aminosäurezusammensetzung etwas unterschiedliche Kette, genannt $\alpha 2$, zusammengesetztes Molekül. Dieser Kollagentyp wird Kollagen A genannt. Die Unterschiede zwischen der $\alpha 1$ - und der $\alpha 2$ -Kette sind groß genug, um nach Denaturierung eine Trennung auf CM-Cellulose zu erreichen (Piez et al., 1961 und 1963).

Daneben wurden in letzter Zeit noch weitere genetisch verschiedene Kollagentypen entdeckt, die von der Struktur $(\alpha 1)_2\alpha 2$ abweichen. So konnten von der Arbeitsgruppe um E.J. Miller im Knorpel ein Kollagen der Struktur $(\alpha)_3$, genannt Kollagen C, und in der Haut ebenfalls ein Kollagen dieser Struktur, genannt Kollagen S, doch mit jeweils unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung nachgewiesen werden (Miller und Matukas, 1969; Miller et al., 1971).

Deutlicher von diesen Kollagentypen in Bezug auf die Aminosäurezusammensetzung (und auch auf den Kohlenhydratanteil) abgegrenzt erscheinen die Kollagene von niedrig entwickelten Tieren (Pikkareinen und Kulonen, 1967 und 1969; Nordwig und Hayduk, 1969), und bemerkenswerterweise das Basalmembrankollagen (Kefalides, 1972); sie besitzen die Struktur $(\alpha)_3$.

Als ein gutes Hilfsmittel zum Vergleich der verschiedenen Kollagentypen haben sich künstliche Quartärstrukturen erwiesen, die Long-Spacing-Segmente (SLS), die aus sauren

Kollagenlösungen bei Zugabe von ATP entstehen. Das nach Anfärben im Elektronenmikroskop sichtbar gemachte Querstreifungsmuster, das ein grobes Abbild der Primärstruktur darstellt, ist bei Kollagen A (vgl. Kühn, 1969), Kollagen C (Stark et al., 1972) und Invertebratenkollagen (Nordwig und Hayduk, 1969) identisch. Daraus folgt, daß die Primärstruktur (und damit auch die Tertiärstruktur) der verschiedenen Kollagene, ungeachtet der signifikanten Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung, Prinzipien aufweisen muß, die von der phylogenetischen Entwicklung unberührt geblieben sind.

Um einen genauen Vergleich dieser verschiedenen Kollagentypen durchführen zu können, und natürlich ebenso für andere Fragestellungen, ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz der α -Ketten notwendig. Dafür ist Voraussetzung, daß die α -Untereinheiten des Kollagens zu definierten Bruchstücken abgebaut werden können. Die CNBr-Spaltung hat sich für diese Aufgabe besonders bewährt und ist zu einer Standardmethode in der Kollagenchemie geworden (Bornstein und Piez, 1966b, 1966c; Butler et al., 1967). Hierbei wird die denaturierte Polypeptidkette spezifisch am Methionin gespalten. Man erhält die sogenannten CNBr-Peptide, die am Carboxylende Homoserin, das Umwandlungsprodukt des Methionins, tragen. Die CNBr-Peptide von Kollagen A und C, teilweise von Kollagen S und von Basalmembrankollagen sind inzwischen isoliert und sogar teilweise sequenziert worden (z.B. Wendt et al., 1972). Es hat sich dabei gezeigt, daß Homologien sowohl zwischen der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette des Kollagens A als auch zwischen den Ketten der Kollagene A, C und S auftreten. Für die Bestimmung der gesamten Aminosäuresequenz einer α -Kette ist Voraussetzung, daß die Reihenfolge der CNBr-Peptide innerhalb der Kette ermittelt wird. Diese Zuordnung zum Gesamtmolekül kann u.a. mit Hilfe von ungespaltenen Doppelpeptiden geschehen oder, bei größeren CNBr-Peptiden, nach Renatu-

rierung auf elektronenoptischem Wege aufgrund ihres Querstreifungsmusters (Rauterberg und Kühn, 1968; Piez et al., 1969). Die Möglichkeit einer elektronenoptischen Zuordnung beruht auf der Fähigkeit der CNBr-Peptide, wie die α -Kette selbst die tripelhelicale Struktur zurückbilden zu können. Durch Zugabe von ATP werden Long-Spacing-Segment-Fragmente ausgefällt, die anschließend zur Sichtbarmachung des Querstreifungsmusters mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat angefärbt werden. Die polaren Gruppen erscheinen dann als dunkle Querstreifen, während die apolaren, nicht angefärbten Bereiche als helle Querstreifen zu erkennen sind.

Beiträge zur Evolution des Kollagens

Die Kollagenforschung hatte sich zunächst für ihre vielfältigen Untersuchungen aus begreiflichen Gründen vornehmlich solcher Modellobjekte bedient, die erstens leicht zugänglich sind und zweitens phylogenetisch dem Menschen nicht allzu fern stehen. (Es ist bekannt, daß viele Krankheiten, wie z.B. Rheumatismus und Sklerodermie ihre Ursache in einer Störung des Kollagenstoffwechsels haben).

Nachdem man aber einen besseren Einblick in den molekularen Aufbau des Vertebratenkollagens gewonnen hatte, tauchte natürlich die Frage nach der Evolution des Kollagenmoleküls auf. 1967 postulierte Pikkarainen, daß das Kollagenmolekül ursprünglich aus drei identischen α -Ketten aufgebaut gewesen sei (Pikkarainen und Kulonen, 1967). Besonders die Arbeitsgruppe um Nordwig beschäftigte sich in der Folgezeit damit, den experimentellen Nachweis für diese Hypothese zu erbringen (Nordwig und Hayduk, 1967, 1969; Nordwig et al., 1970; Hieber, 1970; Stemberger, 1972).

Als Untersuchungsobjekt erwies sich die Seeanemonenart *Actinia equina* L., eine Coelenteratenspezies, als besonders geeignet. Im folgenden seien einige wichtige Merkmale

des aus Actinien gewonnenen Kollagens (Actinocol) angeführt und mit den bei Vertebratenkollagenen erhaltenen Ergebnissen verglichen.

Bei vielen Eigenschaften physikalisch-chemischer Natur besteht, innerhalb der Grenzen der jeweiligen Bestimmungsmethoden, Übereinstimmung zwischen Actinocol und Vertebratenkollagenen (Moleküllänge, spezifische optische Drehung, Sedimentationsverhalten, Molekulargewicht u.a.). Das gilt auch für die Querstreifungsmuster natürlicher und artifizieller Quartärstrukturen (Fibrillen, SLS).

Der T_M -Wert liegt beim Actinocol (27.6°C) niedriger als bei den Säugetierkollagenen.

Die Disk-Elektrophorese nach Reisfeld, die Ionenaustauscherchromatographie an CM-Cellulose und die Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel A-15 m machen sehr wahrscheinlich, daß Actinocol nur aus einem α -Kettentyp aufgebaut ist; für Kollagen C, S und Basalmembrankollagen ist diese $(\alpha)_3$ -Struktur inzwischen nachgewiesen worden. Die reduzierbaren Quervernetzungen beim Actinocol wie auch bei anderen Invertebratenkollagenen sind in ihrem chemischen Aufbau mit den bei Vertebraten gefundenen identisch (Eyre und Glimcher, 1971; Bailey, 1971). Allerdings scheinen die bisher bearbeiteten Invertebratenkollagene wesentlich stärker quervernetzt zu sein, was die Gewinnung löslichen Ausgangsmaterials sehr erschwert.

A U F G A B E N S T E L L U N G

Wie in der Einleitung erwähnt, sprachen alle in der Arbeitsgruppe um Nordwig am Actinocol erhaltenen Ergebnisse dafür, daß dieses Kollagen aus drei identischen α -Ketten aufgebaut ist. Aufgabe dieser Arbeit sollte es nun sein, auf dem Wege über die Isolierung der CNBr-Peptide des Actinocols die Existenz nur eines α -Kettentyps sicherzustellen.

Außerdem sollte eine Charakterisierung der CNBr-Peptide vorgenommen werden, um auf der Basis der CNBr-Peptide einen Vergleich mit anderen bereits gut untersuchten Kollagenarten vornehmen zu können. Es sollte so die Voraussetzung geschaffen werden, detailliertere Aussagen über die Evolution des Kollagenmoleküls zu ermöglichen.

ERGEBNISSE

I. Wahl des Ausgangsmaterials für die CNBr-Spaltung

Zum Erhalt der CNBr-Peptide für die Primärstrukturuntersuchungen des Kollagens hat sich folgendes Konzept als besonders günstig erwiesen: Das kollagenhaltige Gewebe wird nach Homogenisieren mit sauren Puffern bzw. verdünnten Säuren (ergibt säurelösliches Kollagen = SLK) oder neutralen Puffern (ergibt neutralsalzlösliches Kollagen) ausgiebig extrahiert, wobei ein mehr oder weniger großer Teil des Kollagens monomolekular in Lösung geht. Ein gewisser Prozentsatz kann jedoch durch die genannten Solventien nicht in Lösung gebracht werden (unlösliches Kollagen). Das lösliche Kollagen wird zur Reinigung mehrmals umgefällt und nach Denaturieren mit Hilfe der CM-Cellulose-Chromatographie in seine Untereinheiten aufgetrennt. Bei der nun folgenden CNBr-Spaltung (durchgeführt, wie eingangs erwähnt, zum Erhalt definierter Peptide) wird zumeist die α -Fraktion eingesetzt, da hier (im Gegensatz zu den Fraktionen, welche β - bzw. γ -Komponenten enthalten) die Zahl der CNBr-Peptide wegen fehlender Quervernetzungen überschaubarer ist und so die Reinigung der Peptide weniger Schwierigkeiten bereitet (Butler et al., 1967).

Im folgenden soll nun beschrieben werden, welche Ausgangssituation bei dem aus Actinien gewonnenen Kollagen für die Anwendung dieses Vorgehens bestand und welche Ergebnisse erzielt wurden.

1. Actinocol (SLK): Versuche zur Ausbeuteerhöhung

Den Versuchen, SLK in größerer Menge aus der homogenisierten Mesogloea der Actinie zu gewinnen, war in früheren Arbeiten (Nordwig et al., 1970) ein geringer Erfolg beschieden, da nur 1-3% vom insgesamt vorhandenen Kollagen mit sauren Puffern

in Lösung gingen. Das ist sehr wenig, bedenkt man, daß die Mesogloea einer Actinie durchschnittlich nur ca. 0.2 g Kollagen enthält, und daß bei der weiteren Reinigungsprozedur sehr große Verluste durch Unlöslichwerden des ursprünglich gelösten Kollagens entstehen (wahrscheinlich aufgrund freier, quervernetzungsbereiter Aldehydgruppen).

Es wurde versucht, die Ausbeute an SLK durch einen besseren Gewebsaufschluss zu erhöhen. Die homogenisierte Mesogloea wurde mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend im Mörser zerstoßen. Eine noch intensivere Zerkleinerung des Gewebes konnte durch Homogenisieren der Mesogloea und darauffolgendes Zerreiben des mit Sand und Trockeneis vermischten Gewebebreies erreicht werden (Tab.1).

Tab. 1: Ausbeute an Actinocol (SLK) nach verschiedenem Gewebeaufschluß (in %, bezogen auf insgesamt vorhandenes Kollagen).

Art der Behandlung	Ausbeute an SLK
normale Aufarbeitung	1 - 3
mit flüssigem Stickstoff	4
mit Sand und Trockeneis	4.2

Der Kollagengehalt wurde durch Messung des 4-Hydroxyprolins bestimmt (Versuch 9).

Die auf diese Weise erhältliche Menge an SLK erschien jedoch zu gering, um die durchzuführenden Untersuchungen bewerkstelligen zu können.

Die geringe Löslichkeit des Actinienkollagens in sauren und auch in neutralen Puffern, der hohe Gehalt an β - und α^1 -Komponenten und Polymeren (ersichtlich aus Disk-Elektrophorese und Molekularsiebchromatographie), auch nach Abbau im nativen Zustand mit Pepsin, legten die Vermutung nahe, daß die Mesogloea der Actinie hauptsächlich stark quervernetztes Kollagen enthält.

Eine experimentelle Möglichkeit, die Quervernetzungsbereitschaft in Vertebratenkollagenen zu unterbinden, besteht darin, jungen Tieren Lathyrogene wie z.B. BAPN zu verabreichen (s. Einleitung). Es wurde nun geprüft, inwieweit Lathyrogene bei lebenden Actinien, einer Invertebratenart, eine Steigerung der Löslichkeit des Kollagens zur Folge haben.

Dem Meerwasser der in Aquarien gehaltenen Actinien wurden β -Aminopropionitril-Fumarat (rein, Serva Heidelberg), Cysteamin-HCl (reinst, Serva Heidelberg) und D-Penicillamin (reinst, Serva Heidelberg) in verschiedener Konzentration zugesetzt; in einem vierten Becken wurden unbehandelte Actinien gehalten. Die mit Cysteamin und D-Penicillamin behandelten Tiere gingen nach ca. 4 Monaten ein, zeigten aber keine signifikante Erhöhung des Gehaltes an SLK. Allen behandelten Tieren war gemeinsam, daß sie nach kurzer Zeit wesentlich an Größe verloren. Bei den in BAPN-haltigem Wasser lebenden Actinien war eine deutliche Steigerung des Gehaltes an SLK zu beobachten (Tab. 2).

Tab. 2: Ausbeute an Actinocol (SLK) (in %, auf insgesamt vorhandenes Kollagen bezogen) nach Behandlung von lebenden Actinien mit BAPN.

Dauer der Behandlung	mit BAPN ($2 \times 10^{-5} \text{ m}$)	Kontrolle
2 Monate	2.0	1.2
4 Monate	5.4	2.0
8 Monate	6.0	2.6
10 Monate	12.5	2.8

Der Gehalt an SLK wurde nach Extraktion der homogenisierten Mesogloea mit 1%iger Essigsäure durch Messung des 4-Hydroxyprolins bestimmt (Versuch 9).

Das Ergebnis als solches ist nicht uninteressant; prinzipiell erscheint es möglich, einen experimentellen Lathyrismus bei Invertebraten zu erzeugen. Da aber diese Verfahren zur Gewinnung größerer Mengen an SLK zu langwierig und umständlich sind, mußte ein anderer Weg beschritten werden.

2. Actinocol (PLK): CNBr-Spaltung nach Denaturierung und Versuche einer Auftrennung der Peptide

Nordwig et al. (1970) erhöhten die Löslichkeit des Actinienkollagens durch Vorbehandlung des Gewebes mit Pepsin bei niedrigen Temperaturen (Versuch 1). Bei diesem Verfahren wird wahrscheinlich ein Teil der an den Enden im nichthelicalen Teil des Kollagenmoleküls sitzenden Quervernetzungen abgespalten (Bornstein et al., 1966a; Zimmermann et al., 1970). Die native Konformation des Kollagenmoleküls bleibt dabei erhalten; sein Verhalten in der Disk-Elektrophorese, CM-Cellulose-Ionenaustauscherchromatographie, Molekularsiebchromatographie, das Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifuge, sowie die Aminosäureanalyse ließen keinen Unterschied zum säurelöslichen Actinocol erkennen (Hieber, 1970). Nach mehrmaligem Umfällen des enzymatisch gelösten Kollagens gegen $\text{KCl}/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer war bei der weiteren Aufarbeitung keine proteolytische Restaktivität des Pepsins zu beobachten. Das durch Behandlung mit Pepsin in Lösung gebrachte Actinienkollagen wurde Actinocol (PLK) genannt.

Das so gereinigte und gefriergetrocknete Actinocol (PLK) wurde nun denaturiert und mittels CNBr an den Methioninresten gespalten (Versuch 4.3.). Eine vorherige Auftrennung des PLK in seine Untereinheiten wurde aus folgendem Grund vorerst nicht vorgenommen:

Wie von Hieber (1970) gezeigt wurde, läßt sich mit der CM-Cellulose-Chromatographie keine Auftrennung in α -, β - und γ -Fraktionen erreichen; die Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel A-1.5 m zur Isolierung der α -Komponente würde für präparatives Arbeiten in größerem Stil jedoch sehr zeitaufwendig sein, da in den zumeist verwendeten Elutionspuffern das PLK nur zu ca. 1.5-2 mg/ml löslich ist.

Es wurde versucht, das durch CNBr-Spaltung erhaltene Peptidgemisch durch Ionenaustauscherchromatographie an CM-Cellulose

(Abb.1) bzw. durch Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel P-150 (Abb.2) aufzutrennen.

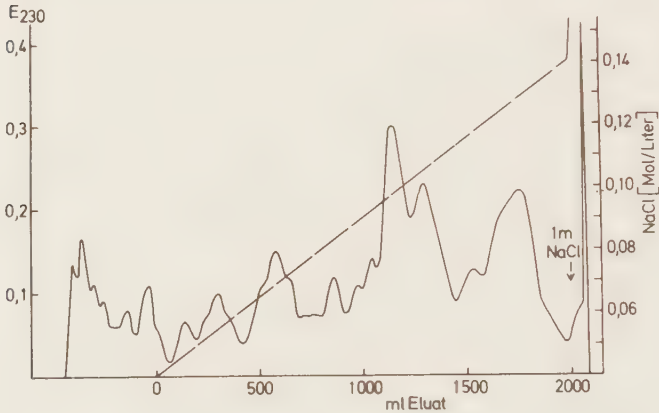


Abb. 1: Fraktionierung der CNBr-Peptide von denaturiertem Actinocol (PLK) an CM-Cellulose.
Startpuffer: 0.02 m Natriumcitrat (pH 3.6),
0.04 m Natriumchlorid
Limitpuffer: Startpuffer und 0.1 m Natriumchlorid
Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
Gesamtvolumen: 2000 ml
Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.1.2.

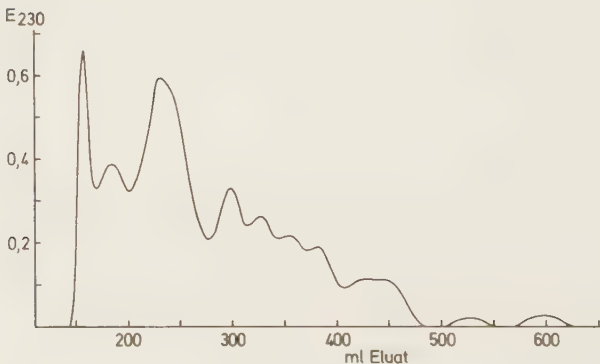


Abb. 2: Fraktionierung der CNBr-Peptide von denaturiertem Actinocol (PLK) am Molekularsieb Bio-Gel P-150.
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.4.

Alle Fraktionen waren jedoch, wie die disk-elektrophoretische Untersuchung zeigte, auch nach weiteren chromatographischen Auftrennungsversuchen sehr heterogen. Der eingeschlagene Weg mußte deswegen als nicht gangbar bezeichnet werden; bei Annahme eines α -Kettentyps und bei Vorliegen von 10 Methioninresten mußten ja 11 CNBr-Peptide erwartet werden. Diese aus einem derart komplexen Gemisch zu isolieren und zudem einen Nachweis für stöchiometrische Verhältnisse zu führen, erschien wenig aussichtsreich. Es mußte also doch die isolierte α -Kette als Ausgangsmaterial für die CNBr-Spaltung herangezogen werden.

Eine wichtige Feststellung konnte aber aufgrund der oben geschilderten, negativen Ergebnisse getroffen werden: Die Elutionsdiagramme der Ionenaustauscher- und Molekularsiebchromatographie des CNBr-Peptidgemisches von Actinocol (PLK) unterscheiden sich deutlich von denen anderer, mit CNBr-behandelten Kollagenarten (vgl. z.B. Butler et al., 1967). Das dürfte als Evidenz für eine von anderen Kollagenen verschiedene Methioninverteilung aufgefaßt werden.

Die CNBr-Spaltung wurde auch an der nicht enzymatisch behandelten, lediglich sehr fein homogenisierten Mesogloea durchgeführt. Die CM-Cellulose- und Gelfiltrations-Chromatogramme des Peptidgemisches zeigten im Vergleich zu dem mit CNBr abgebauten Actinocol (PLK) nur sehr geringfügige Unterschiede. Daher wurde auf eine Abbildung verzichtet.

Dies belegt erneut, daß Pepsin nur sehr geringe Veränderungen am nativen Actinocol verursacht.

II. Darstellung und Charakterisierung von Actinocol- α (PLK)

Aus den zuvor erwähnten Gründen mußte also der aufwendigere Weg über die Isolierung reiner α -Ketten gegangen werden. Wie aus der Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel A-1.5 m ersichtlich ist, stellt die α -Fraktion des Actinocols (PLK) ca. 1/5 des Gesamtmaterials dar. Gibt es nun Möglichkeiten,

den Anteil der α -Fraktion zu erhöhen?

Bornstein et al. (1966a) berichten, daß CNBr unter Bedingungen, die nicht die helicale Konformation des Kollagenmoleküls zerstören, eine teilweise Umwandlung der β -Komponente in zwei den α -Ketten sehr ähnliche Fragmente bewirkt. Die Reaktionsprodukte unterscheiden sich von der α -Kette durch das Fehlen kurzer Peptide des N-terminalen, nichthelicalen Bereichs. Im Fall von säurelöslichem Rattenkollagen (Bornstein et al., 1966a) verschwindet in der Disk-Elektrophorese die β -Komponente nach Behandlung mit CNBr fast vollständig zugunsten der α -Komponente. CNBr-Behandlung von nativem Kollagen wirkt also ähnlich wie eine Inkubation mit Pepsin. Es wurde deswegen versucht, die beiden Effekte additiv auszunutzen und Actinocol (PLK) im nativen Zustand zur weiteren Entfernung von Quervernetzungsbereichen mit CNBr nachzubehandeln.

Die CNBr-Spaltung des Actinocols (PLK) wurde bei 13°C während 24 Stunden durchgeführt (es wurde auch 48, 72 und 96 Stunden lang inkubiert; dabei wurden aber in der Disk-Elektrophorese Bruchstückbanden gefunden).

Wie die disk-elektrophoretische Untersuchung eindeutig zeigte, stieg der Anteil an α -Fraktion jedoch bei diesem Verfahren nicht signifikant an.

Mit der CM-Cellulose-Chromatographie kann keine Auftrennung des Actinocols in Subfraktionen erreicht werden (Hieber, 1970), was bei Annahme dreier identischer α -Ketten verständlich ist; damit entfällt für dieses Material eine gängige Methode, größere Mengen an α -Ketten in kurzer Zeit zu isolieren. Hieber trennte Actinocol (PLK) an Bio-Gel A-15 m in seine Untereinheiten, konnte aber nur sehr geringe Mengen an Ausgangsmaterial einsetzen (ca. 10 mg).

1. Molekularsiebchromatographie von nicht reduziertem Actinocol (PLK) an Bio-Gel A-1.5 m

Im folgenden werden Versuche zur Isolierung der α -Kette mit Bio-Gel A-1.5 m als Trenngel geschildert. Es hat gegenüber Bio-Gel A-15 m den Vorteil, daß es einen höheren Durchfluss und eine bessere Abtrennung der α - von der β -Komponente erlaubt. Als Puffersystem diente 0.05 m Tris, das 1 m an Calciumchlorid ist und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7.5 eingestellt wird. Die Säulenabmessungen wurden so gewählt, daß ca. 30 ml (ca. 50 mg) der Actinocol (PLK)-Lösung noch gut getrennt wurden. Es müssen große Volumina eingesetzt werden, da Actinocol (PLK) in Lösung sehr viskos ist und in höheren Konzentrationen das Molekularsiebgel verstopfen würde.

Die Chromatographie von Actinocol (PLK) an Bio-Gel A-1.5 m war anfänglich sehr problematisch, da aus nicht bekannten Gründen häufig eine Bruchstückbildung der α -Kette zu beobachten war. Eine weitere drastische Verminderung der Ausbeute an der α -Komponente geschah bei der Gefriertrocknung der gegen 0.1 n Essigsäure dialysierten α -Fraktion. Die gereinigten α -Ketten aggregierten zu höhermolekularen, sogar in 6 m Harnstoff unlöslichen Produkten.

2. Reduktion von Actinocol (PLK) mit Natriumborhydrid

Wenn die geschilderte Aggregationsneigung der α -Ketten auf quervernetzungs-bereite Aldehyde zurückzuführen ist, müßte man durch Reduktion der Aldehyde des Actinocols (PLK) mit NaBH_4 diese unerwünschte Eigenschaft ausschalten können. Diese Überlegung erwies sich als richtig. Zudem wurde bei dem reduzierten Material auf der Molekularsiebsäule keine Bruchstückbildung mehr beobachtet. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. Es kann nur vermutet werden, daß durch die Reduktion mit NaBH_4 etwa noch vorhandene proteolytische Enzyme inaktiviert wurden.

Somit ergibt sich der in Versuch 2 beschriebene Arbeitsgang für die Reduktion der α -Ketten. Eine Denaturierung vor der Reduktion des Actinocols (PLK) erwies sich als unumgänglich, da die Reduktion des nativen Materials ein Unlöslichwerden des eingesetzten Kollagens zur Folge hatte. Dies läßt sich folgendermaßen erklären: Das in tripelhelicaler Struktur vorliegende native Kollagenmolekül besitzt wahrscheinlich labile Quervernetzungen, die durch Reduktion stabilisiert werden. Beim Denaturieren, also beim Zusammenbrechen der quarternären Struktur werden diese labilen Bindungen jedoch teilweise gespalten und im "random coil" eine "zufällige" Lage einnehmen. Das bedeutet, daß quervernetzungs-bereite Partner zumeist nicht in entsprechender Nähe und Anordnung zu finden sind. Findet also eine Reduktion statt, wenn der größtmögliche Teil des Kollagens als α -Kette vorliegt, dann ist das Zusammentreffen von zwei Partnern, die gemeinsam eine Quervernetzung ausbilden, wesentlich unwahrscheinlicher.

3. Isolierung von reduziertem Actinocol- α (PLK) am Molekularsieb

Die aus dem reduzierten Actinocol (PLK) nach Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel A-1.5 m erhaltene α -Komponentenfraktion (Abb.3.I.) wurde gegen Aqua dest. dialysiert, am Rotationsverdampfer auf ein kleines Volumen eingengt und anschließend bei -18°C gelagert. Die aus mehreren Läufen gesammelten α -Fraktionen wurden, wie in Versuch 3 angegeben, für eine Rechromatographie an der gleichen Säule vorbereitet. Das Elutionsbild der rechromatographierten α -Fraktion ist in Abb. 3.II. dargestellt.

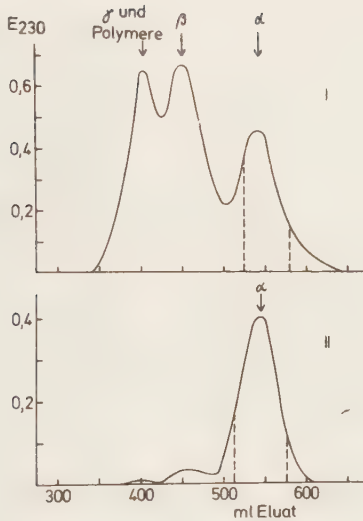


Abb. 3: Isolierung der α -Ketten von reduziertem Actinocol (PLK) am Molekularsieb Bio-Gel A-1.5 m
I. Trennung in die Untereinheiten
II. Rechromatographie der α -Fraktion
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.5.

4. Prüfung auf Einheitlichkeit der α -Fraktion

a) CM-Cellulose-Chromatographie

Zur Untersuchung der Homogenität bzw. Heterogenität der am Molekularsieb erhaltenen α -Fraktion wurde eine Ionenaustauscherchromatographie an CM-Cellulose durchgeführt. (Abb.4). Es wurden Bedingungen gewählt, die beim Kollagen A gute Trennergebnisse liefern (Müller et al., 1971).

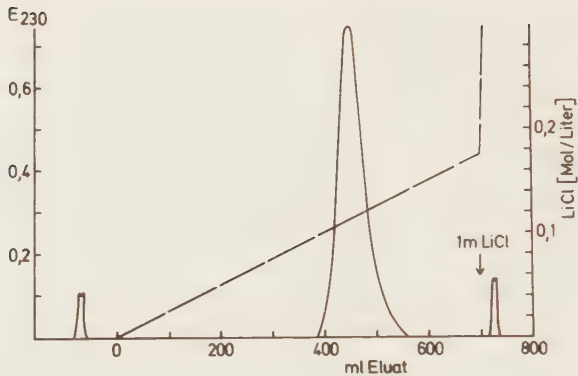


Abb. 4: Prüfung der Einheitlichkeit der α -Fraktion von reduziertem Actinocol (PLK) an CM-Cellulose.
 Startpuffer: 0.02 m Kaliumacetat,
 1 m Harnstoff (pH 4.8)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.20 m Lithiumchlorid
 Gradient: Linearer Lithiumchloridgradient
 Gesamtvolumen: 800 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.1.1.

Abgesehen von einem sehr geringen Vor- und Nachpeak, die nicht weiter untersucht wurden, erwies sich die α -Fraktion als rein und homogen.

b) Disk-Elektrophorese in SDS

In der sehr empfindlichen Disk-Elektrophorese in SDS wurde die α -Fraktion auf Einheitlichkeit geprüft. Als Vergleichssubstanz diente SLK von Kalbshaut (Abb.5A). Es sind keine Spuren einer Verunreinigung oder Bruchstückbildung zu erkennen (Abb.5C). Während die α -Bande an der erwarteten Stelle erscheint, liegt bei einer Kontrollanalyse die β -Bande des Actinocols in einem vergleichsweise hohen Molekulargewichtsbereich (Abb.5B), was im Widerspruch zur Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel A-1.5 m steht (Abb.6). Die Ursache hierfür ist unbekannt.

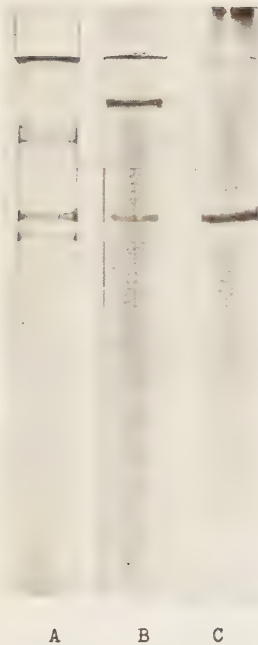


Abb. 5:

SDS-Disk-Elektropherogramme von

Kalbshautkollagen und Actinocol

A Kalbshautkollagen (SLK)

B Actinocol (PLK)

C aus Actinocol (PLK) isolierte
 α -Ketten

Experimentelle Angaben siehe Ver-
such '14 (das Trenngel war 7.5%ig
an Acrylamid).

5. Molekulargewichtsbestimmung am Molekularsieb

Zur Molekulargewichtsbestimmung von Actinocol- α (PLK) wurde eine mit SLK von Kalbshaut kalibrierte Gel-Chromatographiesäule (Bio-Gel A-1.5 m) verwendet (Abb.6). Das Molekulargewicht wurde nach einem in Kapitel III.7. beschriebenen Verfahren zu 95.000 berechnet (Abb.7).

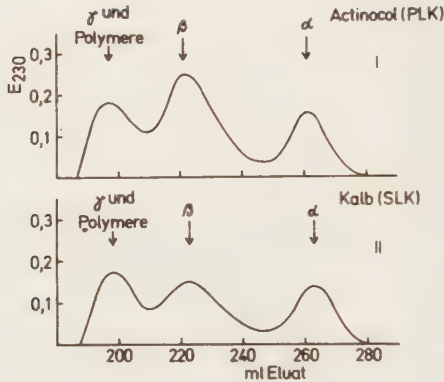


Abb. 6: Trennung der Kollagenuntereinheiten am Molekularsieb Bio-Gel A-1.5 m und Vergleich mit Kalbshautkollagen
 I. Actinocol (PLK)
 II. Kalb (SLK)
 Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.5.a.

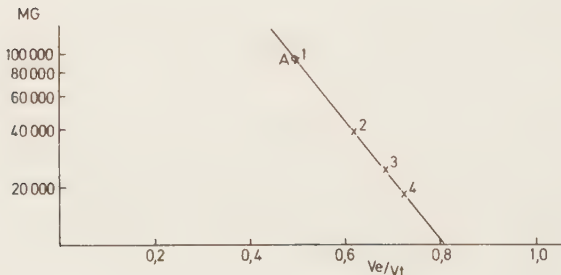


Abb. 7: Molekulargewichtsbestimmung von Actinocol- α (PLK) an Bio-Gel A-1.5 m
 Experimentelle Angaben siehe Versuch 8
 Eichsubstanzen: CNBr-Peptide und α 1-Kette von Rattenhautkollagen
 1 : α 1-Kette
 2 : CB3-7
 3 : CB7
 4 : CB6
 A : Actinocol- α (PLK)

6. Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse der α -Fraktion wird in Tabelle 3 (S.46) wiedergegeben. Bereits Hieber (1970) hatte festgestellt, daß die Aminosäureanalysen der α -Fraktion und des unfractionierten Kollagens keine Unterschiede zeigen:

Die genaue Bestimmung des Methioningehaltes, der Aufschluss über die Anzahl der zu erwartenden CNBr-Peptide gibt, war aber mit Unsicherheiten verbunden. Obwohl dem sauren Hydrolyseansatz Mercaptoäthanol als reduzierendes Agens hinzugegeben wurde, um vorhandenes bzw. entstandenes Methioninsulfoxyd in Methionin zurückzuverwandeln (Keutmann und Potts, 1969), mußten dennoch Schwankungen der Methioninwerte (7-10 Met/1000 Aminosäurereste) in Kauf genommen werden.

III. Isolierung und Charakterisierung der CNBr-Peptide von Actinocol- α (PLK)

1. Vorbemerkung zur Nomenklatur der CNBr-Peptide

Die CNBr-Peptide (abgekürzt: CB) der α -Kette von Actinocol (PLK) werden in der Reihenfolge ihrer Elution am Molekularsieb Bio-Gel P-150 mit arabischen Zahlen versehen, wobei das größte Einzelpeptid die Zahl 1 (CB1) erhält. Erscheinen bei der Molekularsiebchromatographie mehrere Peptide in einer Fraktion, so werden diese nach Trennung am Phosphorcellulose-Ionenaustauscher entsprechend ihrer Elutionsfolge von geringerer zu höherer Ionenstärke durchnummeriert.

2. CNBr-Spaltung von Actinocol- α (PLK)

Die CNBr-Spaltung des Actinocol- α (PLK) wurde in drei verschiedenen Medien durchgeführt, und zwar in 70%iger Ameisensäure (Versuch 4.1.), in Salzsäure bei pH 1.5 (Versuch 4.2.) und in 6 m Lösungen von Harnstoff, die mit Salzsäure auf pH 1.5 eingestellt wurden (Versuch 4.3.).

Unspezifische Spaltungen konnten, wie die Auftrennung des CNBr-Peptidgemisches zeigte, in allen drei Fällen nicht beobachtet werden. Die vollständigste Spaltung, das bedeutet die geringste Menge an Methionin in der Aminosäureanalyse des Abbaugemisches, wurde in 6 M Harnstoff bei pH 1.5 erreicht. Obwohl der Anteil an unvollständig gespaltenem Material, verglichen mit dem CNBr-Abbauprodukt von Vertebratenkollagen, noch verhältnismäßig hoch war, wurde im allgemeinen dieses Verfahren angewendet. Später zeigte sich, daß für die Isolierung des bei der CNBr-Spaltung anfallenden kleinsten Peptids (CB11) ein salzfreies Medium günstig ist. Zu seiner Isolierung wurde deswegen die CNBr-Spaltung in 70%iger Ameisensäure durchgeführt, welche anschließend zusammen mit überschüssigem CNBr und Folgeprodukten durch Gefriertrocknung entfernt werden kann.

3. Vortrennung der Peptide durch Molekularsiebchromatographie

Im Unterschied zur Vortrennung der CNBr-Peptide von Vertebratenkollagen am CM-Cellulose-Ionenaustauscher, erwies sich im Fall des CNBr-Peptidgemisches von Actinocol eine Fraktionierung am Molekularsieb Bio-Gel P-150 als günstig. Das CNBr-Peptidgemisch wurde an Bio-Gel P-150 in 7 Fraktionen aufgetrennt (Abb.8), die als Fraktionen I-VII bezeichnet wurden. Das Elutionsbild ist im Vergleich zu dem mit CNBr gespaltenen Actinocol (PLK) (s. Abb.2) klarer und weniger heterogen. Das Chromatogramm unterscheidet sich deutlich von dem eines CNBr-Abbaugemisches von Kollagen A $\alpha 1$ (ohne Abb.). Zum besseren Auffinden und Isolieren der möglicherweise vorhandenen kleinen Peptide wurde allerdings eine Molekularsiebchromatographie an einem engerporigen Gel vorgeschaltet. Das gefriergetrocknete Peptidgemisch wurde in diesem Falle an einer mit 0.1 N Essigsäure äquilibrierten Bio-Gel P-4-Säule in drei Fraktionen getrennt (Abb.9), die als a,b,c bezeichnet wurden. Fraktion a wurde nach Gefriertrocknung an Bio-Gel P-150 weiter aufgetrennt. Fraktion b, die CB11 enthält, wird in Kapitel III.4.f. behandelt. Fraktion c enthält kein Protein, wie die Aminosäureanalyse zeigte.

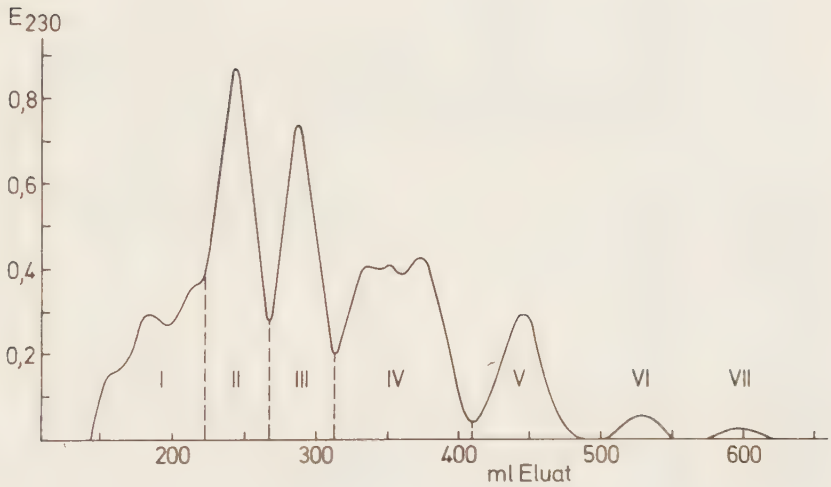


Abb. 8: Fraktionierung des CNBr-Abbaugemisches der α -Kette von Actinocol (PLK) an Bio-Gel P-150
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.4.

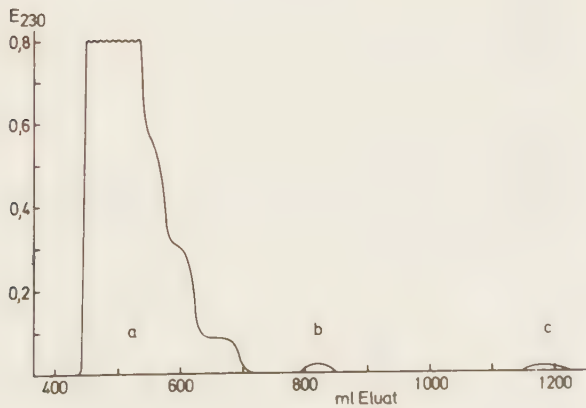


Abb. 9: Molekularsiebchromatogramm des CNBr-Abbaugemisches von Actinocol- α (PLK) an Bio-Gel P-4
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.2.

4. Reindarstellung der Peptide⁺

Im folgenden wird die weitere Auftrennung der Fraktionen I-VII (s.Abb.8) an Ionenaustauschern und Molekularsieben beschrieben. Zur besseren Übersicht dient das Schema in Abb. 10.

Fraktion I enthält nach der Aminosäureanalyse methioninhaltes, also ungespaltenes Material und wird an anderer Stelle behandelt (Kapitel III.5).

a) CB1 und CB3-4

Fraktion II (s.Abb.8) wurde gefriergetrocknet und an Bio-Gel P-150 rechromatographiert. Die in Abb. 11 angegebene Fraktion wurde an CM-Cellulose weiter aufgetrennt. Der Peak II₂ wurde in der in Abb. 12 angegebenen Weise geschnitten und das darin enthaltene Protein an einer PC-Säule chromatographiert (s.Abb.13).

⁺ Aminosäurezusammensetzung der CNBr-Peptide s.Tab.3 (S.46).

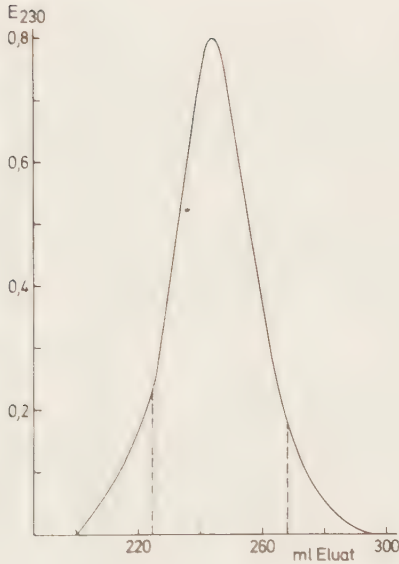


Abb. 11:
Rechromatographie der
Fraktion II (s. Abb. 8)
an Bio-Gel P-150.
Experimentelle Angaben
siehe Versuch 7.4.

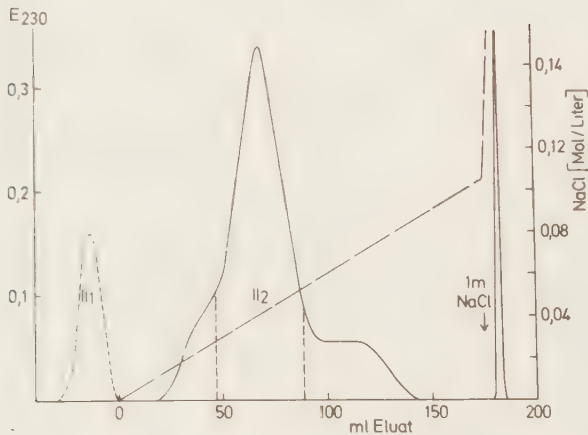


Abb. 12: Auftrennung der rechromatographierten Fraktion II
(s. Abb. 11) an CM-Cellulose.
Startpuffer: 0.02 m Natriumacetat (pH 4.8)
Limitpuffer: Startpuffer und 0.12 m Natriumchlorid
Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
Gesamtvolumen: 200 ml
Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.1.3.

Fraktion II_{2b} (Abb. 13) wurde nun auf Bio-Gel P-150 (Abb.14) und in der SDS-Disk-Elektrophorese (Abb.15) auf Einheitlichkeit untersucht. Das so gewonnene Peptid wurde CB1 genannt. Peak II_{2a} (Abb.13) wurde nicht weiter untersucht; er enthält ungespaltenes Material (Aminosäureanalyse, Vorkommen von Methionin).

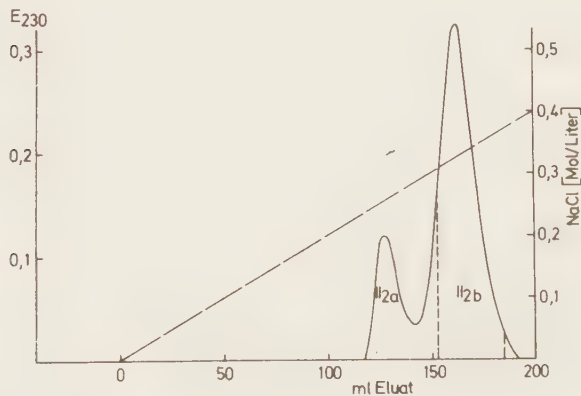


Abb. 13: Auftrennung der Fraktion II_2 (s.Abb.12) an Phosphorcellulose.
 Startpuffer: 0.001 m Natriumacetat (pH 3.6)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.4 m Natriumchlorid
 Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
 Gesamtvolumen: 200 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.2.

Bei einigen Aufarbeitungen erschien bei der Chromatographie der Fraktion II an CM-Cellulose (ohne vorherige Rechromatographie an Bio-Gel P-150) ein Vorpeak (Abb.12, II_1) der mit dem Startpuffer eluiert wurde. Dieser Vorpeak, von dem bei allen Aufarbeitungen insgesamt nur ca. 1 mg erhalten wurde, chromatographiert an PC und an Bio-Gel P-150 einheitlich. Die Aminosäureanalysen, verbunden mit der Molekulargewichtsbestimmung am Molekularsieb ermöglichten die Identifizierung als ungespaltenes CB3-4 (s.Kap.III.8.).

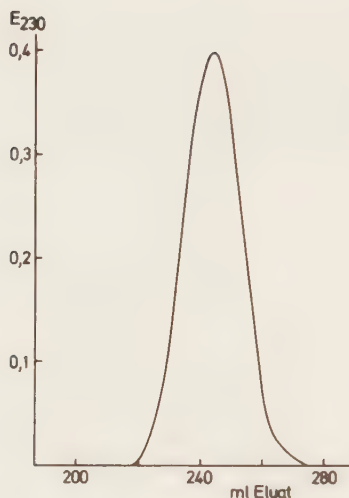


Abb. 14:
Chromatographie der Fraktion II^{2b} (s. Abb. 13) an Bio-Gel^{2b} P-150
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.4.

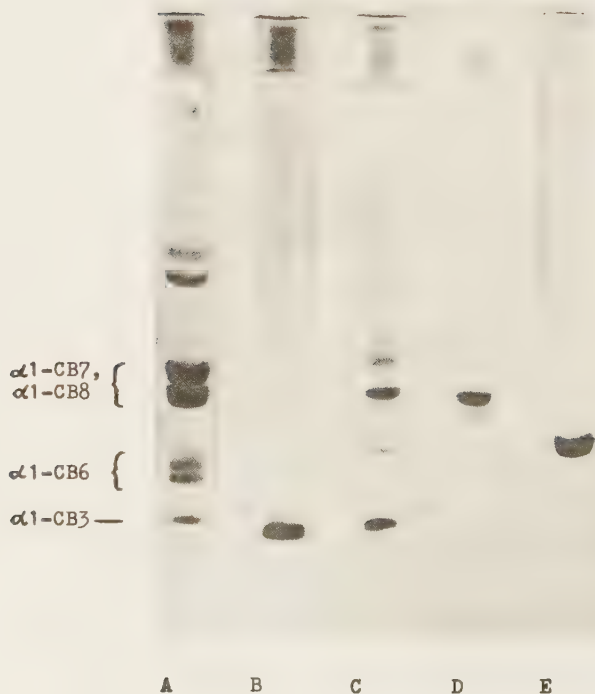


Abb. 15:
SDS-Disk-Elektropherogramme
A unfraktioniertes CNBr-Peptidgemisch der α1-Kette von Rattenhautkollagen
B CB2 von Actinocol-α (PLK)
C unfraktioniertes CNBr-Peptidgemisch von Actinocol-α (PLK)
D CB1 von Actinocol-α (PLK)
E CB6-7 von Actinocol-α (PLK)
Experimentelle Angaben siehe Versuch 14
(Das Trenngel war 10%ig an Acrylamid)

Wie Abb. 15D zeigt, wurden für CB1 in der Disk-Elektrophorese zwei verschieden starke Banden gefunden. Stöchiometrieberechnungen (s.Kap.III.9) und Einheitlichkeitsuntersuchungen in der Gel- und Ionenaustauscherchromatographie deuteten aber auf nur ein Peptid hin. Ebenso zeigte die Aminosäureanalyse verschiedener Fraktionen des Peaks II_{2b} der Chromatographie an PC (s.Abb.13) sowie an Bio-Gel P-150 (s.Abb.14) keine signifikanten Unterschiede. Das Verhalten von CB1 in der SDS-Disk-Elektrophorese kann möglicherweise durch eine geringfügige, in der Aminosäureanalyse und der Molekularsiebchromatographie nicht feststellbare Kettenverkürzung verursacht sein. Ebenso kann die schwache Bande natürlich auch als eine geringe, mit den chromatographischen Mitteln nicht zu entfernende Verunreinigung gedeutet werden.

Um sicher zu gehen, daß während der Aufarbeitung von Fraktion II kein echtes CNBr-Peptid verlorengegangen war, wurde diese an PC aufgetrennt, aber ohne vorherige Rechromatographie an Bio-Gel P-150 sowie Chromatographie an CM-Cellulose (Abb.16).

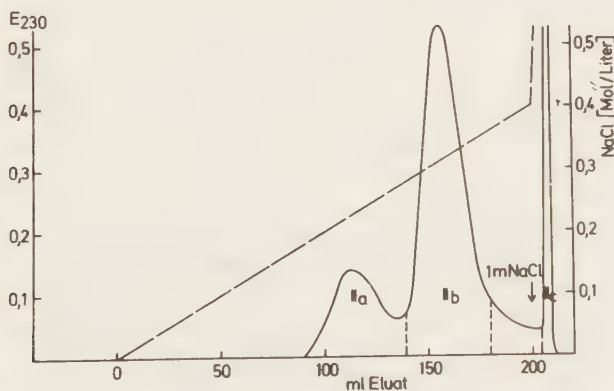


Abb. 16: Auftrennung von Fraktion II (s.Abb.8) an Phosphorcellulose.
 Startpuffer: 0.001 m Natriumacetat (pH 3,6)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.4 m Natriumchlorid
 Gradient: Linearer Natriumchloridgradient.
 Gesamtvolumen: 200 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.2.

Die Aminosäurezusammensetzung der Fraktion II_c war der von $CB1$ sehr ähnlich. Fraktion II_a hatte einen hohen Methioninwert und enthält daher hauptsächlich ungespaltenes Material. Die mengenmäßig unbedeutende Fraktion II_c ist heterogen und enthält u.a. $CB2$ aus Fraktion III . Aus diesen Ergebnissen kann daher geschlossen werden, daß sich in Fraktion II (s.Abb.8) außer $CB1$ kein weiteres Einzelpeptid befindet.

b) $CB2$ und $CB6-7$

Fraktion III (s.Abb.8) wurde an CM-Cellulose in zwei Hauptpeaks (Abb.17) aufgespalten, wobei der eine (III_1) bei sehr niedriger Ionenstärke und der andere (III_4) bei sehr hoher Ionenstärke (verglichen mit $CNBr$ -Peptiden von Vertebratenkollagen) eluiert wurde.

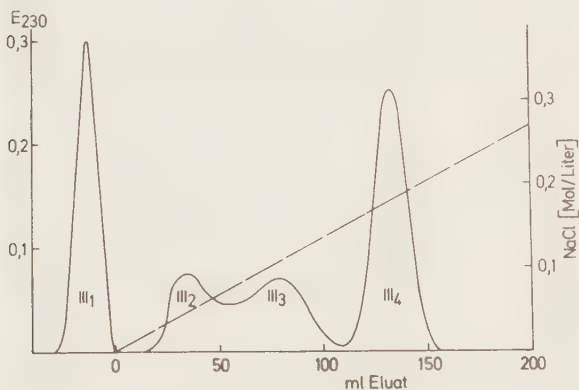


Abb. 17: Auftrennung der Fraktion III (s.Abb.8) an CM-Cellulose
 Startpuffer: 0.02 m Natriumacetat (pH 4.8)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.27 m Natriumchlorid
 Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
 Gesamtvolumen: 200 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.1.3.

Die weitere Chromatographie von III_1 an PC (Abb.18) und an Bio-Gel P-150, sowie von III_4 an Bio-Gel P-150 (Abb.19) und die SDS-Disk-Elektrophorese (s.Abb.15B und 15E) belegten, daß es sich bei Fraktionen III_1 und III_4 um zwei einheitliche Peptide handelt. Das in Fraktion III_4 enthaltene Peptid wurde CB2 genannt. Fraktion III_1 enthielt das methioninhaltige, ungespaltene Doppelpeptid CB6-7 (s.Kap.III.8). Die Fraktionen III_2 und III_3 enthielten geringe Mengen an CB1 sowie methioninhaltige Peptide und ergaben an der Bio-Gel P-150-Säule ein heterogenes Bild. Sie wurden daher nicht weiter untersucht.

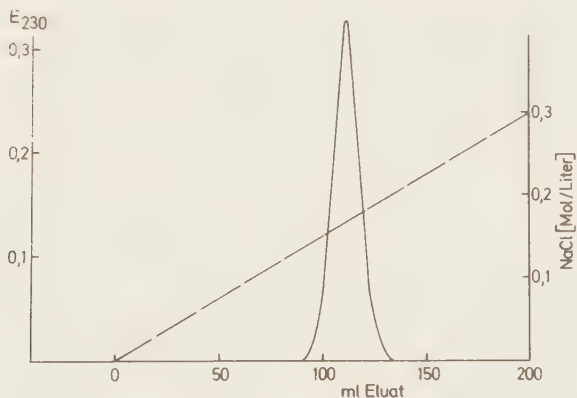


Abb. 18: Chromatographie der Fraktion III_1 (s.Abb.17) an Phosphorcellulose.
Startpuffer: 0.001 m Natriumacetat (pH 3.6)
Limitpuffer: Startpuffer und 0.3 m Natriumchlorid
Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
Gesamtvolumen: 200 ml
Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.2.

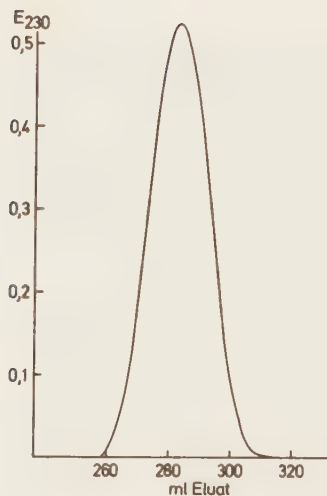


Abb. 19:
Chromatographie der Fraktion
III₁ (s. Abb. 17) an Bio-Gel
P-150
Experimentelle Angaben
siehe Versuch 7.4.

c) CB3, CB4, CB5, CB6 und CB5-10

Die Isolierung der in Fraktion IV (s. Abb. 8) enthaltenen Peptide gestaltete sich wesentlich schwieriger. Da eine Rechromatographie dieser Fraktion auf einer engerporigen, für diesen Molekulargewichtsbereich an sich besser geeigneten Säule von Bio-Gel P-10 keinen Vorteil brachte, wurde Fraktion IV direkt an CM-Cellulose aufgetrennt (Abb. 20). Es wurden zwei deutlich voneinander abgetrennte Fraktionen (IV₁ und IV₂) erhalten. Fraktion IV₁ wurde bereits mit dem Startpuffer eluiert. Fraktion IV₂ erscheint sehr heterogen.

Fraktion IV₁ wurde nun auf einer Säule von Bio-Gel P-150 weiter aufgetrennt (Abb. 21).

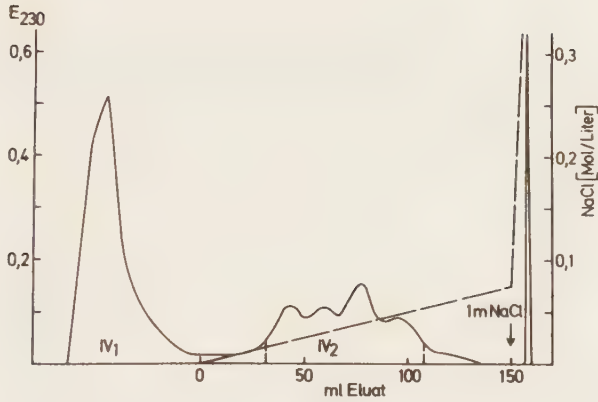


Abb. 20: Auftrennung der Fraktion IV (s. Abb. 8) an CM-Cellulose.
 Startpuffer: 0.02 m Natriumacetat (pH 4.8)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.1 m Natriumchlorid
 Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
 Gesamtvolumen: 200 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.1.3.

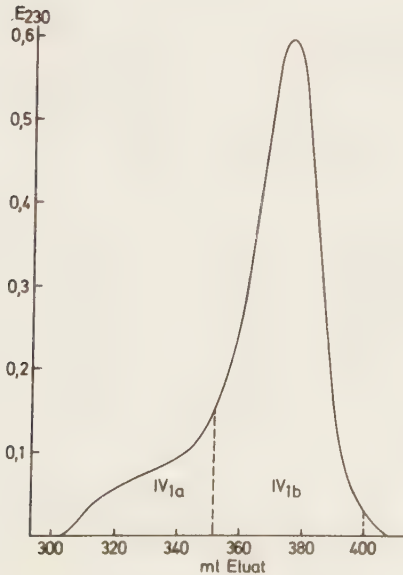


Abb. 21:
 Auftrennung der Fraktion IV₁ (s. Abb. 20) an Bio-Gel P-150.
 Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.4.

Fraktion IV_{1a} (s.Abb.21) enthielt unvollständig gespaltene Peptide und wurde nicht weiter fraktioniert. Peak IV_{1b} wurde mittels Chromatographie an PC in die Fraktionen IV_{1b α - δ} aufgetrennt (Abb.22).

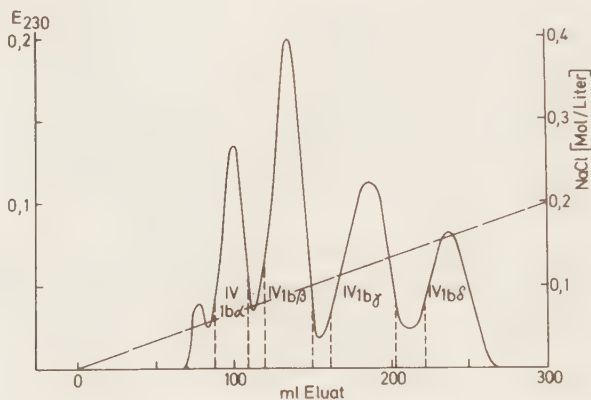


Abb. 22: Auftrennung der Fraktion IV_{1b} (s.Abb.21)
 an Phosphorcellulose
 Startpuffer: 0.001 m Natriumacetat (pH 3.6)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.2 m Natriumchlorid
 Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
 Gesamtvolumen: 300 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.2.

Die Fraktionen IV_{1b α} und IV_{1b β} repräsentieren ein einziges Peptid, wie die Aminosäureanalyse und die Chromatographie an Bio-Gel P-150 (Abb.23) ergab. Das Peptid wurde CB4 genannt. Die Chromatographie der Fraktionen IV_{1b γ} und IV_{1b δ} an Bio-Gel P-150 und P-10 (Abb.24,25) bestätigten jeweils deren Einheitlichkeit. In Fraktion IV_{1b γ} ist CB5 und in Fraktion IV_{1b δ} ist CB6 enthalten.

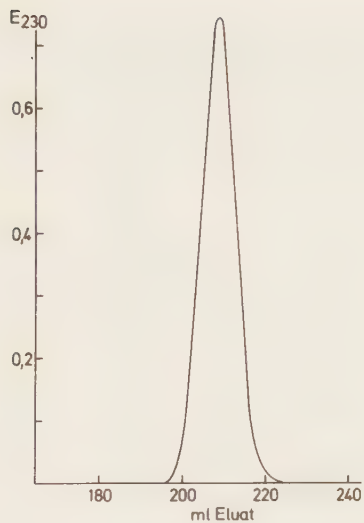


Abb. 23:
Chromatographie der vereinigten Fraktionen IV und IV_{1bα} (s. Abb. 22) an Bio-Gel_{1bβ} P-10
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.3.

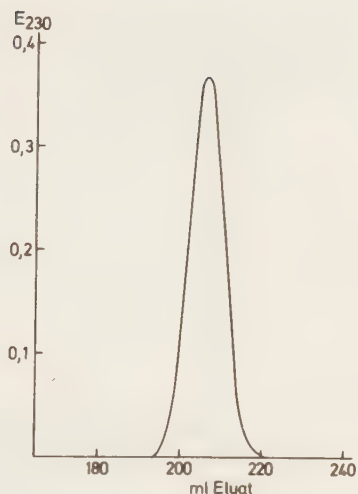


Abb. 24:
Chromatographie der Fraktion IV_{1bα} (s. Abb. 22) an Bio-Gel_{1bβ} P-10
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.3.

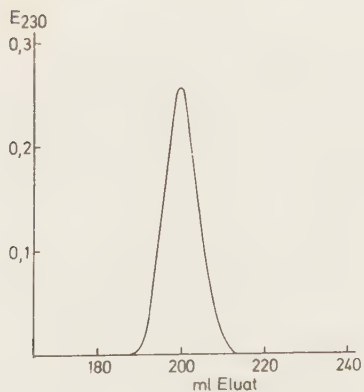


Abb. 25:
Chromatographie der Fraktion IV_{1bα} (s. Abb. 22) an Bio-Gel_{1bβ} P-10
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.3.

Fraktion IV₂ erschien zwar an CM-Cellulose sehr heterogen (s. Abb. 20), ergab aber auf PC nur zwei Subfraktionen (Abb. 26; IV_{2a}, IV_{2b}).

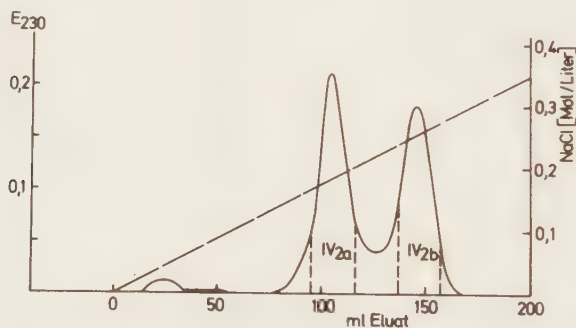


Abb. 26: Chromatographie von Fraktion IV₂ (s. Abb. 20) an Phosphorcellulose
 Startpuffer: 0.001 m Natriumacetat (pH 3.6)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.35 m Natriumchlorid
 Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
 Gesamtvolumen: 200 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.2.

Es ist häufig zu beobachten, daß die Chromatographie an CM-Cellulose (pH 4.8) auch von einheitlichen Peptiden ein heterogenes Elutionsbild liefert, da bei diesem pH und in diesem Ionenstärkebereich bereits sehr feine Molekülunterschiede, wie z.B. die Carboxylform bzw. die Lactonform des C-terminalen Homoserins, ein anderes chromatographisches Verhalten bedingen können (s.z.B. Butler et al., 1967).

Fraktion IV_{2a} (s. Abb. 26) wurde an Bio-Gel P-10 chromatographiert. Der symmetrische, scharfe Peak (ohne Abb.) enthielt den für ein Doppelpeptid erforderlichen Methioninwert und konnte aufgrund der Aminosäurezusammensetzung und des Molekulargewichtes als CB5-10 identifiziert werden (s. Kap. III.8).

Fraktion IV_{2b} (s.Abb.26) wurde ebenfalls an Bio-Gel P-10 (Abb.27) auf Einheitlichkeit geprüft. Das als CB₃ bezeichnete Peptid zeigte in der Aminosäureanalyse einen geringen Methioningehalt (0.2 Reste pro Peptid; s.Tab. 3, S.46)

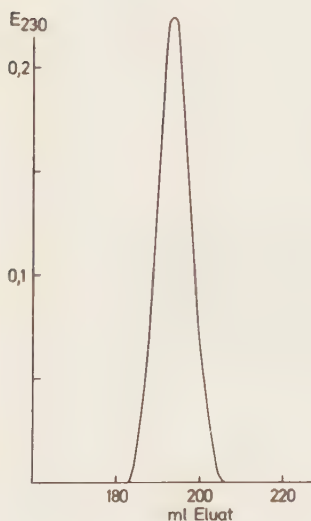


Abb. 27:
Chromatographie der Fraktion
IV_{2b} (s.Abb.26) an Bio-Gel
P 2₁₀
Experimentelle Angaben siehe
Versuch 7.3.

Der geringe Methioningehalt konnte auch nach erneuter Chromatographie des CB₃ an CM-Cellulose, wobei eine Aufspaltung in drei Peaks mit gleicher Aminosäurezusammensetzung erhalten wurde (Abb.28), nicht beseitigt werden. Aufgrund der von allen anderen Peptiden verschiedenen Aminosäurezusammensetzung (die auch ein Doppelpeptid ausschloß), mußte es sich um ein echtes CNBr-Peptid handeln.

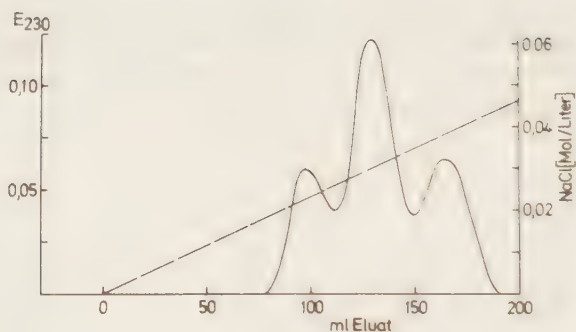


Abb. 28: Chromatographie der Fraktion IV_{2b} (s. Abb. 26)
 an CM-Cellulose
 Startpuffer: 0.02 m Natriumacetat (pH 4.8)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.07 m Natriumchlorid
 Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
 Gesamtvolumen: 300 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.1.3.

d) CB7, CB8, CB9

Fraktion V (s. Abb. 8), die an Bio-Gel P-150 deutlich abgetrennt von den übrigen Fraktionen erscheint, konnte mittels Chromatographie an PC (pH 3.6) in die drei Fraktionen V₁, V₂, V₃ aufgetrennt werden (Abb. 29). Fraktion V₂ ist in zwei Peaks aufgespalten, die jedoch aufgrund der Aminosäureanalyse zu einem einzigen Peptid gehören.

Die drei Fraktionen V₁, V₂, V₃ wurden getrennt nochmals an PC bei einem anderen pH-Wert (4.8) chromatographiert. Die Fraktionen V₂ und V₃ enthielten jeweils nur ein Peptid, CB8 (V₂) und CB9 (V₃). Die Molekularsiebchromatographie von V₂ und V₃ an Bio-Gel P-10 (ohne Rechromatographie an PC bei pH 4.8) unterstrich dieses Ergebnis (Abb. 30, 31).

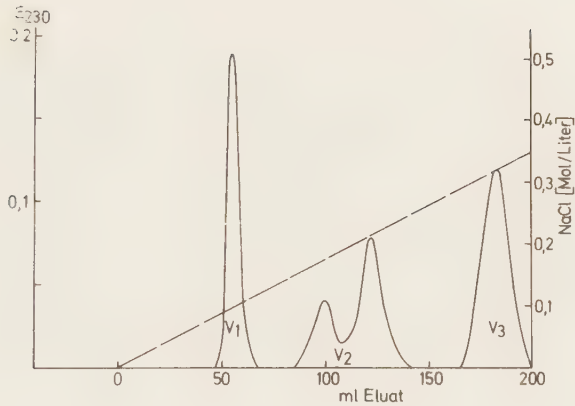


Abb. 29: Auftrennung der Fraktion V (s. Abb. 8) an Phosphorcellulose bei pH 3.6
 Startpuffer: 0.001 m Natriumacetat (pH 3.6)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.35 m Natriumchlorid
 Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
 Gesamtvolumen: 200 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.2.

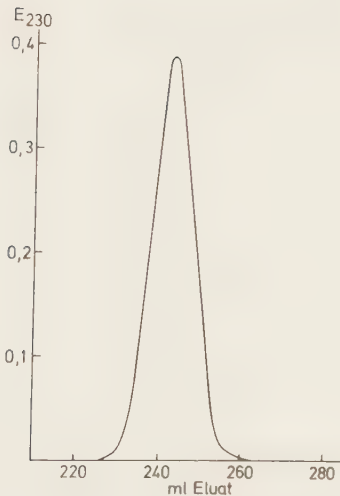


Abb. 30:
 Chromatographie der Fraktion V_2 (s. Abb. 29) an Bio-Gel P-10
 Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.3.



Abb. 31:
 Chromatographie der Fraktion V_3 (s. Abb. 29) an Bio-Gel P-10
 Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.3.

Die Fraktion V_1 , die an der PC-Säule bei pH 3.6 (s. Abb. 29) und an Bio-Gel P-10 (Abb. 32) als einheitlicher scharfer Peak chromatographierte, trennte sich bei pH 4.8 in zwei Komponenten (Abb. 33); die eine, V_{1b} , wies einen normalen Homoserinwert (ein Homoserinrest pro Peptid) auf (Nomenklatur: CB7), dagegen die andere, V_{1a} , einen stark herabgesetzten Homoserinwert (0.5 Homoserinreste pro Peptid) und einen geringen Gehalt an Methionin (0.3 Methioninreste pro Peptid). Die übrigen Aminosäurewerte unterschieden sich nur sehr geringfügig.

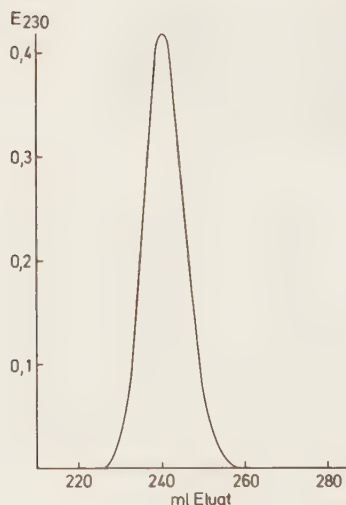


Abb. 32:
Chromatographie der Fraktion V_1 (s. Abb. 29) an Bio-Gel P-10
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.3.

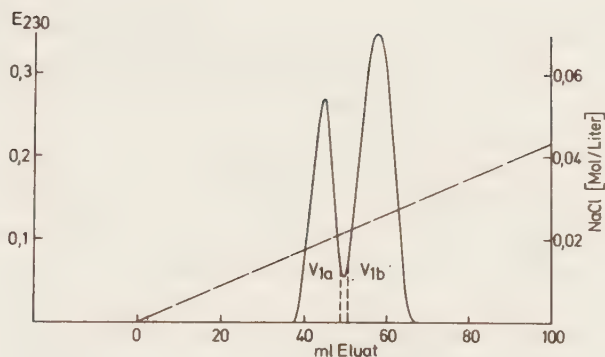


Abb. 33: Auftrennung der Fraktion V, (s. Abb.29) an Phosphorcellulose bei pH 4.8
 Startpuffer: 0.002 m Natriumacetat (pH 4.8)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.08 m Natriumchlorid
 Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
 Gesamtvolumen: 200 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.2.

Diese Befunde kann man versuchen folgendermaßen zu deuten: Actinocol wird mit Pepsin in Lösung gebracht. Die kurzen Peptide, die das Pepsin von den nicht-helicalen Enden des Moleküls bzw. der α -Ketten abspaltet, dürften wegen der wenig ausgeprägten Spezifität des Enzyms wohl sicher verschieden lang sein. Das hätte zur Folge, daß die α -Untereinheiten bezüglich der terminalen Aminosäuresequenzen heterogen sind. So könnte, z.B. ein in der unmittelbaren Nähe des Carboxylendes stehender Methioninrest bei der Behandlung mit Pepsin teilweise abgespalten werden, bzw. äußerst nah an das neu entstandene Kettenende rücken. Das würde bedeuten, daß bei der anschließenden CNBr-Spaltung Peptide

- a) ohne Homoserin entstehen können (wenn nämlich Methionin abgespalten wurde),
- b) mit Homoserin (Methionin nicht abgespalten; durch CNBr

in Homoserin umgewandelt) oder,
 c) im Fall einer durch chemische Veränderung des Methionins nicht möglichen Spaltung, methioninhaltige Doppelpeptide. Die sonst praktisch identische Aminosäurezusammensetzung der beiden Komponenten (V_{1a} und V_{1b}) spricht für ein Gemisch aus (a) und (c) in Fraktion V_{1a} , aber gegen die Annahme eines weiteren CNBr-Peptids. CB7 (Fraktion V_{1b}) könnte also das carboxylendständige Peptid sein, genauer gesagt, das Peptid, das in unmittelbarer Nachbarschaft zum C-Terminus der α -Kette steht. Eine weitere Stütze für die Annahme, daß es sich bei CB7 um das carboxylendständige Peptid handelt, ist der verminderte Homoseringehalt des CB6-7 (s.Tab.6, S.51).

e) CB10

Fraktion VI (s.Abb.8) spaltete an PC (Abb.34) in drei Komponenten (VI_1 , VI_2 , VI_3) auf, die in der Aminosäureanalyse keine signifikanten Unterschiede zeigten.

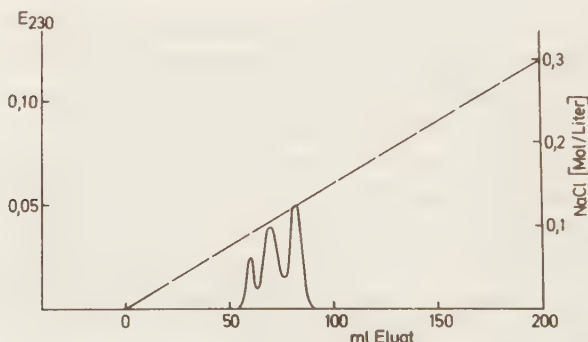


Abb. 34: Chromatographie der Fraktion VI (s.Abb.8) an Phosphorcellulose
 Startpuffer: 0.001 m Natriumacetat (pH 3.6)
 Limitpuffer: Startpuffer und 0.3 m Natriumchlorid
 Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
 Gesamtvolumen: 200 ml
 Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.2.

In der Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel P-10 (Abb.35) trennten sich die vereinigten Fraktionen VI nicht auf, was den Befund der Aminosäureanalyse untermauert.

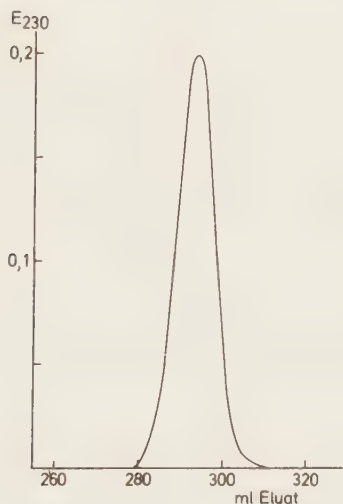


Abb. 35:
Chromatographie der vereinigten Fraktionen VI₁, VI₂ und VI₃ (s.Abb.34) an Bio- Gel P-10
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.3.

Das zugrundeliegende Peptid wurde CB10 genannt. Auftrennungen selbst von reinen Peptiden werden oft beobachtet, so auch bei der Auftrennung der CNBr-Peptide von Vertebratenkollagenen (Butler et al., 1967; Rauterberg und Kühn, 1971). Die Ursachen hierfür müssen für den Fall der CNBr-Peptide des Actinocols- α (PLK) noch untersucht werden.

f) CB11

Fraktion VII der Chromatographie an Bio-Gel P-150 (s.Abb.8) ist identisch mit Fraktion b der Trennung an Bio-Gel P-4 (s.Abb.9). Chromatographiert man das CNBr-Peptidgemisch zuerst an Bio-Gel P-4, erscheint deswegen die Fraktion VII nicht im Elutionsbild der Bio-Gel P-150-Chromatographie. An PC (Abb.36) war eine Aufspaltung der Fraktion VII in drei

Peaks zu beobachten; in Peak VII₁, wurde aber aufgrund der Ergebnisse der Aminosäureanalyse kein Protein gefunden. Peak VII₂ und VII₃ zeigten eine identische Aminosäurezusammensetzung und enthalten das Peptid CB11.

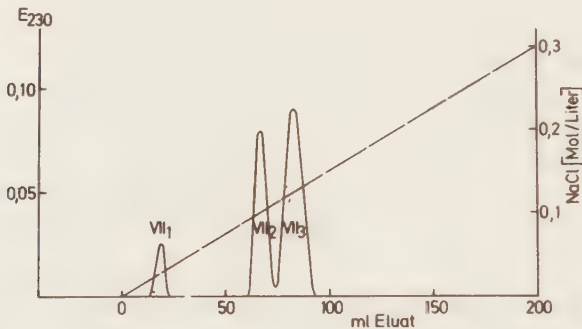


Abb. 36: Auftrennung der Fraktion VII (s.Abb.8) an Phosphorcellulose
Startpuffer: 0.001 m Natriumacetat (pH 3.6)
Limitpuffer: Startpuffer und 0.3 m Natriumchlorid
Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
Gesamtvolumen: 200 ml
Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.2.

5. Versuch zur Auftrennung der Fraktion I

Aufgrund der Molekularsiebtrennung müßten sich in Fraktion I höhermolekulare Peptide als in Fraktion II befinden (s.Abb.8). Diese sollten aber bei 230 nm unter der Annahme dreier identischer α -Ketten (wofür alle anderen Ergebnisse dieser Arbeit sprechen) eine höhere Extinktion zeigen. Da dies nicht der Fall ist, kann das Vorhandensein eines vollständig mit CNBr gespaltenen Peptids, das höhermolekular als CB1 ist, verneint werden.

Eine Untermauerung findet diese Aussage durch die quantitative Auswertung der in Abb.8 gezeigten Fraktionierung der CNBr-Peptide von Actinocol- α (PLK) an Bio-Gel P-150 (s.Kap.III.9).

Es sollte aber eine, wenigstens vorläufige Charakterisierung der Fraktion I (s.Abb.8) vorgenommen werden, in der man nach den in der Aminosäureanalyse gefundenen Methioninwerten überwiegend unvollständig gespaltenes Material vermuten konnte. Fraktion I wurde an Bio-Gel A-1.5 m, einem für die Auftrennung höhermolekularer Peptide besser geeigneten Molekularsieb, in drei Fraktionen aufgetrennt.

Jede dieser Fraktionen wurde an CM-Cellulose weiter fraktioniert. Wie jedoch die SDS-Disk-Elektrophorese der einzelnen Subfraktionen zeigte, konnten zwar in keinem Fall reine Komponenten gewonnen werden; dennoch belegen diese Ergebnisse, vor allem die Aminosäureanalysen der Subfraktionen, daß Fraktion I aus methioninhaltigen, durch CNBr unvollständig gespaltenen Peptiden besteht.

Eine Aufarbeitung von Fraktion I sollte aber als Zukunftsaufgabe im Auge behalten werden, um mit Hilfe der unvollständig gespaltenen Peptide die Reihenfolge der CNBr-Peptide innerhalb der α -Kette zu ermitteln.

6. Aminosäureanalyse

Die experimentellen Bedingungen sind in den Versuchen 11 und 13 angegeben.

Die Aminosäurezusammensetzung der α -Kette von Actinocol (PLK) und der CNBr-Peptide CB1-CB11 wurden in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tab. 3: Aminosäurezusammensetzung der CNBr-Peptide der α -Kette von Actinococcol (PLK)

Die Werte werden alle Aminosäurereste pro Peptid angegeben. Werte unter 10 werden auf eine Stelle hinter dem Komma angegeben, Werte über 10 werden zur nächsten ganzen Zahl ab- bzw. aufgerundet (ausgenommen die Werte für die α -Kette). Die Werte für die α -Kette sind auf 1050 Aminosäurereste pro α -Kette umgerechnet.

Aminosäuren	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	Summe CB-Peptide	α -Kette
3-Hyp	5(4.9)	4(4.4)	-	2(1.8)	1(1.4)	-	6(6.4)	-	3(3.4)	1(1.4)	-	22	19.1
4-Hyp	14	17	11	12	11	5(5.2)	6(5.7)	4(4.2)	6(6.2)	3(2.8)	-	89	83.5
Asp	17	12	11	5(4.6)	10	11	3(3.4)	2(2.1)	4(4.0)	2(1.9)	1(1.0)	78	73.1
Thr	11	5(5.3)	3(3.3)	2(1.9)	4(4.1)	9(9.0)	1(1.2)	2(2.0)	1(1.1)	2(1.7)	-	40	37.0
Ser	12	8(8.0)	4(4.0)	3(3.0)	4(4.0)	1(1.0)	2(2.1)	2(2.0)	3(3.1)	1(1.0)	1(1.0)	41	40.5
Hse	1(1.0)	1(1.0)	1(0.9)	1(1.0)	1(1.2)	1(1.0)	1(1.0)	1(1.2)	1(1.0)	1(1.2)	1(1.0)	11	-
Glu	25	13	13	13	5(5.1)	10(9.7)	7(7.2)	6(6.4)	2(2.4)	2(2.0)	-	96	97.2
Pro	18	10(9.8)	5(4.8)	6(6.2)	7(7.0)	5(4.9)	6(6.3)	2(1.5)	2(1.9)	2(2.0)	1(0.9)	63	67.0
Gly	73	55	37	32	32	34	21	18	20	10	5(5.2)	337	339.0
Ala	10	5(5.2)	6(6.0)	9(9.1)	5(5.4)	6(6.2)	3(3.1)	8(7.8)	6(6.3)	1(1.0)	1(1.0)	60	65.3
Val	3(3.0)	5(5.0)	1(1.0)	2(2.0)	1(1.0)	2(2.1)	4(4.1)	-	3(3.0)	1(0.9)	-	22	24.9
Met	-	-	-(0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.8
Ile	6(6.3)	1(1.1)	3(3.1)	-	2(2.0)	3(3.0)	2(1.9)	1(1.0)	2(2.1)	1(0.9)	-	21	21.7
Leu	8(7.9)	6(5.9)	2(1.6)	4(4.0)	4(4.0)	2(1.7)	-(0.4)	1(1.0)	1(1.0)	1(1.0)	1(1.0)	30	29.5
Tyr	-	-	-	-	-	2(2.2)	-	-	-	-	-	2	3.1
Phe	3(2.9)	1(1.0)	1(1.0)	-	1(1.0)	1(0.7)	1(1.0)	1(0.9)	-	-	-	9	8.4
Hyl	5(4.9)	3(2.8)	4(4.2)	1(1.0)	3(2.6)	2(2.0)	-	2(1.6)	2(1.8)	1(0.8)	1(1.0)	24	25.0
His	-	-	-	-	-	1(1.0)	-	-	-	-	-	1	1.4
Lys	3(3.0)	5(4.9)	2(1.9)	2(1.8)	-(0.4)	2(2.3)	1(1.0)	-(0.2)	-(0.2)	-(0.2)	-	15	16.4
Arg	17	17	6(6.3)	3(3.1)	5(4.9)	5(5.0)	3(3.0)	4(4.4)	6(6.2)	2(2.0)	1(1.0)	69	68.4
Gesamt:231	168	110	97	96	102	67	54	62	31	13	1.030		

Es wurde die Zahl der Aminosäurereste pro Kette aufgeführt. Die Messwerte wurden zu ganzen Zahlen aufgerundet und nur für unter 10 liegende exakt angegeben. Die Werte sind Mittelwerte aus mehreren Analysen.

Die Gesamtzahl der Aminosäurereste eines Peptids wurde aus den Molekulargewichtsbestimmungen an Molekularsiebsäulen geschätzt; für die Berechnung dienten die Mikromol-Werte der jeweils in geringster Konzentration vorhandenen Aminosäure als Grundlage. Die Werte für Threonin sind mit 1,08 und die für Serin mit 1,21 multipliziert.

Die Summe der Aminosäurereste aller Peptide steht in guter Übereinstimmung mit der Aminosäurezusammensetzung der intakten α -Kette. Die Ursache für die Abweichung beim Tyrosinwert darf wohl in dem prozentual sehr geringen Vorkommen dieser Aminosäure in der α -Kette gesucht werden, was eine genaue Berechnung unsicher macht.

7. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmungen von CB1 bis einschließlich CB6 wurden auf einer Bio-Gel P-150 Säule vorgenommen, die mit CNBr-Peptiden aus Rattenhautkollagen geeicht worden war (Abb.37). Die Molekulargewichte von CB7 bis CB9 (sowie, zur Kontrolle, von CB3 bis CB6) wurden unter Verwendung des gleichen Kalibrationsgemisches auf Bio-Gel P-10 bestimmt (Abb.38). Zur Molekulargewichtsberechnung wurde auf semilogarithmischen Papier V_e/V_t (V_e = Elutionsvolumen des Peptids) gegen das Molekulargewicht aufgetragen (Experimentelle Angaben siehe Versuch 8).

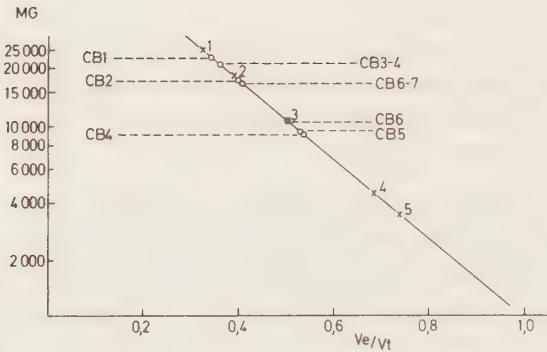


Abb. 37: Molekulargewichtsbestimmung der CNBr-Peptide an Bio-Gel P-150

Experimentelle Angaben siehe Versuch 8

Zur Eichung wurden die folgenden reinen Peptide aus der α 1-Kette von Rattenhautkollagen verwendet (in Klammern ihre Molekulargewichte):

- 1: CB7 (24581)
- 2: CB6 (18048)
- 3: C1 (10332)
- 4: CB4 (4404)
- 5: CB2 (3311)

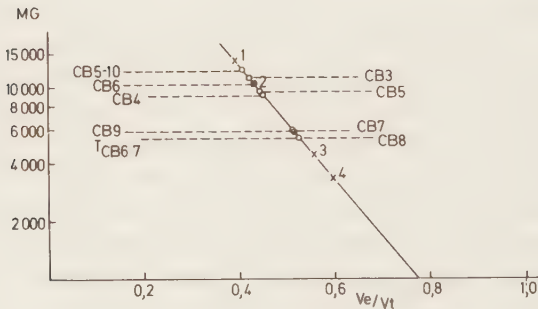


Abb. 38: Molekulargewichtsbestimmung der CNBr-Peptide an Bio-Gel P-10

Experimentelle Angaben siehe Versuch 8

Zur Eichung wurden die folgenden reinen Peptide aus der α 1-Kette von Rattenhautkollagen verwendet (in Klammern ihre Molekulargewichte):

- 1: CB3 (13627)
- 2: C1 (10332)
- 3: CB4 (4404)
- 4: CB2 (3311)

Tab. 4: Molekulargewichte der CNBr-Peptide der α -Kette von Actinocol (PLK)
Die rechte Spalte zeigt Werte, die aufgrund der Aminosäureanalysen (s.Tab.3) und der Kohlenhydratanalysen (s.Tab.8) berechnet wurden.

Peptide	Molekularsiebchromatographie	berechnet
CB1	22 600	23 541
CB2	17 100	17 220
CB3	11 200	11 660
CB4	8 900	8 981
CB5	9 400	9 587
CB6	10 400	10 432
CB7	5 800	6 243
CB8	5 400	5 509
CB9	5 900	6 353
CB10	(3 203) ⁺	3 203
CB11	(1 510) ⁺	1 510
Gesamt:	101 413	104 239
α -Kette	95 000	

⁺Die Molekulargewichte für CB10 und CB11 basieren nur auf den Werten der Aminosäure- und Kohlenhydratanalyse

Die Summe der Molekulargewichte aller Peptide steht in guter Übereinstimmung mit dem aus den Aminosäure- und Kohlenhydratanalysen errechneten Wert (Tab.4). Das Molekulargewicht der intakten α -Kette liegt gegenüber diesen Summierungen etwas niedrig, bewegt sich aber noch innerhalb der Fehlergrenze, die von anderen Kollagenen bzw. Arbeitsgruppen bekannt ist.

Eine Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Disk-Elektrophorese in SDS ist mangels Eichsubstanzen unzuverlässig; zudem liegen die Molekulargewichte von CB3 - CB11 in einer für die Methode ungünstigen Größe.

8. Doppelpeptide

Es ist eine allgemeine Erfahrung, daß die CNBr-Spaltung am Methionin durch eine chemische Veränderung des Methionins unterbunden werden kann.

Auch bei der Isolierung der CNBr-Peptide des Seeanemonen-kollagens fielen einige Peptide an, die nach der Aminosäure-analyse jeweils einen Methioninrest pro Peptid enthalten. Es wurde versucht, diese Peptide durch eine erneute Behandlung mit CNBr zu spalten. Aber auch drastische Bedingungen, wie längere Inkubationszeit mit CNBr (8 Std.), höhere Inkuba-tionstemperatur (35°C) oder größerer Überschuß an CNBr (300fach, bezogen auf Methionin) ließen nicht den geringsten Spaltungserfolg erkennen (Medium jeweils 6 m Harnstoff, pH 1.5).

Die Bestimmung der Molekulargewichte dieser methioninhal-tigen Peptide am Molekularsieb und die Aminosäureanalyse, verglichen mit Molekulargewicht und Aminosäureanalyse der vollständig gespaltenen CNBr-Peptide erlaubten eine Zuordnung dieser Doppelpeptide.

Es wurden die Doppelpeptide CB3-4, CB6-7 und CB5-10 (be-stehend aus CB5 und CB10) gefunden. Ihre Isolierung wurde in Kapitel III.4.a. (CB3-4), III.4.b. (CB6-7) und III.4.c. (CB5-10) beschrieben. Die Elutionsdiagramme der Molekular-siebchromatographie der isolierten Doppelpeptide sind im einzelnen nicht wiedergegeben.

Tab. 5: Molekulargewichte der Doppelpeptide CB3-4, CB6-7 und CB5-10

Peptide	Molekularsiebchromatographie	berechnet ⁺
CB3-4	21 000	20 643
CB6-7	16 500	16 677
CB5-10	12 200	12 792

⁺ berechnet aus den Werten der rechten Spalte in Tab. 4

Aus Abb. 37 und 38 (s.Kap.III.7) und aus Tabelle 5 sind die Molekulargewichte dieser Peptide zu ersehen. Sie stehen in guter Übereinstimmung mit den aus den Einzelpeptiden errechneten Werten.

Tab. 6 zeigt die Aminosäurezusammensetzung der Doppelpeptide und der entsprechenden Einzelpeptide nach Addition. Es wurden nur geringe Abweichungen untereinander festgestellt.

Tab. 6: Aminosäurezusammensetzung der Doppelpeptide CB3-4, CB6-7 und CB5-10

Aminosäuren	CB3-4		CB6-7		CB5-10	
	gefunden	berechnet	gef.	ber.	gef.	ber.
3-Hyp	1.9	2	5.9	6	2.9	3
4-Hyp	21.0	23	10.6	11	12.5	14
Asp	16.2	16	14.9	14	11.5	12
Thr	5.4	5	9.3	10	6.0	6
Ser	7.2	7	4.0	3	4.8	5
Hse	1.2	1	0.9	1	1.1	1
Glu	28.0	26	17.4	17	8.9	7
Pro	11.0	11	11.0	11	8.3	9
Gly	69.0	69	55.0	55	42.0	42
Ala	16.0	15	10.1	9	7.2	7
Val	3.2	3	5.6	6	2.2	2
Met	0.8	-	1.0	-	0.8	-
Ile	3.4	3	4.2	5	3.0	3
Leu	6.0	6	1.9	2	4.5	5
Tyr	-	-	2.1	2	-	-
Phe	1.3	1	1.6	2	1.0	1
Hyl	4.8	5	2.4	2	3.0	3
His	-	-	1.0	1	-	-
Lys	3.5	4	3.9	3	1.0	1
Arg	9.8	9	7.8	8	6.7	7

+ berechnet aus den Werten der Einzelpeptide in Tab.3; es wurden die gefundenen Werte addiert und anschließend ab- bzw. aufgerundet.

CB6-7 steht wahrscheinlich, wie zuvor erläutert, (s.Kap.III 4.d.) am C-terminalen Ende der α -Kette. Über die Stellung von CB5-10 und CB3-4 innerhalb der α -Kette kann keine Aussage gemacht werden.

Dies ist ein erster Ansatz, die Reihenfolge der CNBr-Peptide innerhalb der α -Kette zu bestimmen.

9. Stöchiometrie

Eine Untersuchung über die stöchiometrischen Mengenverhältnisse der CNBr-Peptide sollte bestätigen, ob die α -Fraktion von Actinocol (PLK) aus identischen oder verschiedenen Peptidketten besteht. Weitere Gründe machen eine Feststellung des molaren Verhältnisses der Peptide erforderlich: Eine sich wiederholende Sequenz in der α -Kette könnte zu einem mehrfachen Äquivalent eines Peptids oder mehrerer Peptide führen und damit eine geringere Anzahl an CNBr-Peptiden vortäuschen. Ebenso kann eine zu hohe Anzahl an CNBr-Peptiden wegen geringer, von der α -Kette nicht abzutrennender Verunreinigungen gefunden werden. Der Idealfall des gleichen molaren Verhältnisses aller Peptide wäre dann gegeben, wenn identische α -Ketten vorlägen, diese vollständig gespalten würden und alle Peptide in gleicher Ausbeute, d.h. mit gleich großen Verlusten bei der Isolierung gewonnen werden könnten.

Es kommen beim Kollagen verschiedene Möglichkeiten in Betracht, das molare Verhältnis der Peptide zu ermitteln (die Isolierung der Peptide mußte dabei natürlich aus einem einzigen Ansatz geschehen):

- I. Bestimmung des Gewichtes jedes isolierten Peptids und daraus Berechnung der Mole.
- II. Quantitative Aminosäureanalyse der isolierten Peptide.

III. Bestimmung der Menge eines jeden Peptids durch planimetrisches Ausmessen der Extinktionskurve bei 230 nm mit einem chromatographischen System, das möglichst alle Peptide gleich gut auftrennt. Vorausgesetzt wird dabei, daß alle Peptide die gleiche spezifische Absorption besitzen.

ad I. Das Auswiegen der isolierten Peptide würde im Fall der Actinocol- α (PLK) CNEr-Peptide zu größeren Fehlern führen, da nur geringe Ausgangsmengen zur Verfügung standen und gerade bei den kleineren Peptiden nach den entsprechenden Reinigungsoperationen nur Gewichte in μ -Größenordnung zu erwarten waren.

ad II. Aus praktischen Erwägungen (es müssten von den elf Peptiden jeweils mindestens drei Bestimmungen durchgeführt werden) wurde auf die quantitative Aminosäureanalyse verzichtet.

Ad III. Dieses Verfahren zur Bestimmung der Peptidmenge erwies sich als günstig, da Verluste bei der Vorbereitung für die Aminosäureanalyse bzw. für das Auswiegen (entsalzen, trocknen usw.) vermieden werden und auch geringere Peptidmengen erfasst werden können.

Da durch Chromatographie an Bio-Gel P-150 lediglich CB11 und CB10 von den übrigen Peptiden abgetrennt wurden, war diese Fraktionierungsmethode allein also nicht anwendbar. Die Chromatographie an PC (bei pH 3.6) war für die weitere Auftrennung geeignet. Die Fraktionen II bis VII der Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel P-150 wurden getrennt an PC chromatographiert, und zwar unter genau identischen Bedingungen bei gleichem Säulenvolumen und gleicher Durchflußgeschwindigkeit. Anschließend wurde die Extinktionskurve

planimetriert und der erhaltene Planimeterwert durch die Aminosäureanzahl des betreffenden Peptids dividiert (Tab.7). CB3 konnte unter diesen Bedingungen nicht von CB5-10 getrennt werden. Ebenso war CB6 mit den angegebenen Chromatographiemethoden nicht in genügender Reinheit darzustellen. CB3 und CB6 wurden daher nicht in die stöchiometrischen Berechnungen einbezogen. Für CB7 ergab sich bei Berücksichtigung des in großer Menge anfallenden Doppelpeptids CB6-7 ein zu hoher Planimeterwert; bei verschiedenen Aufarbeitungen schwankte aber das Verhältnis von CB7 zu CB8 und CB9, wie man dem Planimeterwert der Extinktionskurven entnehmen konnte. Bei CB10 lag der Quotient aus Planimeterwert und Anzahl der Aminosäuren zu niedrig; wahrscheinlich liegt dieses Peptid außer in CB5-10 noch an anderer Stelle ungespalten vor. Zudem haben die kleineren Peptide möglicherweise nicht den gleichen Extinktionskoeffizienten. CB11 gab schließlich bei der Chromatographie an PC eine zu geringe Extinktion, um noch einen Planimeterwert genau bestimmen zu können. Die in Tab.7 in Klammern stehenden Werte sind auf CB2 als Rechenbasis bezogen, da dieses Peptid unter den angegebenen Bedingungen sehr rein isoliert werden konnte. Zudem wurden keine Anhaltspunkte dafür gefunden, daß CB2 Bestandteil eines Doppelpeptids ist.

Eine exakte Aussage über das molare Verhältnis der Peptide war schwer zu treffen, da der relativ hohe Gehalt an ungespaltenem Material (u.a. Fraktion I, Abb.8) und die Unmöglichkeit, alle Peptide in einem Chromatographieschritt zu trennen, sicherlich zu größeren Fehlern führen. Um jedoch die Frage nach identischen α -Ketten, nach sich wiederholenden Sequenzen oder nach Verunreinigungen zu beantworten, ist es ausreichend zu unterscheiden zwischen Spuren eines Peptids, 1 Äquivalent oder mehreren Äquivalenten. Daher deuten die Werte in Tabelle 7 auf ein gleiches molares Verhältnis aller Peptide hin.

Tab. 7: Stöchiometrische Verhältnisse der CNBr-Peptide der α -Kette von Actinocol (PLK) nach Chromatographie an Bio-Gel P-150 und Phosphorcellulose

Peptide ¹	Planimeterwert ²	Planimeterwert
		Anzahl der Aminosäuren
CB1	337.5	1.46 (1.06)
CB2	231.2	1.38 (1.00)
CB4	139.9	1.44 (1.04)
CB5	125.4	1.31 (0.95)
CB7	74.9	1.13 (0.82)
CB8	57.4	1.06 (0.77)
CB9	82.4	1.33 (0.96)
CB10	29.7	0.96 (0.70)

¹ CB3 und CB6 waren mit den angegebenen chromatographischen Verfahren nicht in genügender Reinheit zu isolieren. CB11 zeigte eine zu geringe Extinktion.

² Mittelwert aus 2 Bestimmungen

10. Kohlenhydratgehalt

Wie schon in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, zeichnet sich Actinocol gegenüber Kollagen A durch einen um ein Vielfaches erhöhten Kohlenhydratgehalt aus (Nordwig et al., 1970). Der Kohlenhydratanteil wird fast ausschließlich von Glucose und Galactose gestellt (Stemberger, 1972). Galactose ist β -glykosydisch an die Hydroxylgruppe des Hydroxylysins (Gal-Hyl) gebunden, während Glucose α -glykosydisch an Galactosylhydroxylysin gebunden erscheint (Glc-Gal-Hyl).

Im folgenden soll nun in den einzelnen CNBr-Peptiden der Gehalt an dem Monosaccharid Gal-Hyl und dem Disaccharid Glc-Gal-Hyl ermittelt werden; es galt festzustellen, ob hier ähnlich wie beim Kollagen A eine Konzentrierung bestimmter Kohlenhydratkomponenten auf bestimmte Bruchstücke zu beobachten ist (Stemberger, 1972).

Nach den von Stemberger (1972) erarbeiteten Verfahren (Versuch 12 und 13) wurde von allen CNBr-Peptiden eine qualitative und quantitative Bestimmung dieser Kohlenhydrate am Aminosäureanalysator durchgeführt (Tab.8).

Tab. 8: Gehalt der an Hydroxylysin gebundenen Kohlenhydrate in den CNBr-Peptiden der α -Kette von Actinocol (PLK)
Angaben sind Mole pro Mol Peptid

Peptide	<u>Hyl gesamt</u>		<u>Hyl frei</u>		<u>Gal-Hyl</u>		<u>Glc-Gal-Hyl</u>	
	Mole	%	Mole	%	Mole	%	Mole	%
CB1	5.0	100	0.9	18.0	0.6	12.0	3.5	70.0
CB2	2.8	100	-	-	0.4	14.3	2.4	85.7
CB3	4.2	100	0.9	21.4	0.1	2.8	3.2	76.0
CB4	1.0	100	0.9	90.0	-	-	-	-
CB5	2.6	100	0.8	30.8	0.1	3.8	1.7	65.4
CB6	2.0	100	-	-	-	-	2.0	100.0
CB7	-	-	-	-	-	-	-	-
CB8	1.6	100	-	-	0.1	6.3	1.5	93.7
CB9	1.8	100	-	-	0.4	22.2	1.4	77.8
CB10	0.8	100	-	-	0.2	25.0	0.6	75.0
CB11	1.0	100	-	-	-	-	0.9	90.0
Gesamt:	22.8	100	3.5	15.4	1.9	8.3	17.2	75.4

(Werte unter 0.1 wurden nicht angegeben).

Die Zahlen sind Durchschnittswerte aus drei Bestimmungen. Wie aus Tabelle 8 ersichtlich ist, kommen in 9 von 11 Peptiden hydroxylysin-gebundene Zucker vor. Lediglich CB4 ist frei an Gal-Hyl und Glc-Gal-Hyl. CB7 enthält kein Hydroxylysin. Die Zucker liegen zumeist als Disaccharide vor, ausgenommen in CB9 und CB10, wo ein vergleichsweise hoher Gehalt an Monosaccharid gefunden wurde. Diese Untersuchungen zeigen, daß hydroxylysin-gebundene Zucker über fast die gesamte Kette verteilt sind. Die Frage, warum im CB4 eine Glykosylierung des Hydroxylysins nicht erfolgt, kann bis jetzt noch nicht beantwortet werden.

11. Untersuchung am Elektronenmikroskop

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist es möglich, größere CNBr-Peptide mit Hilfe der Elektronenmikroskopie aufgrund ihrer Querstreifungsmuster dem Gesamtmolekül zuzuordnen.

Es wurde versucht, CB1, CB2, CB3, CB4, CB5, das Doppelpeptid CB6-7 sowie Fraktion I der Chromatographie an Bio-Gel P-150 (nach weiterer Auftrennung an CM-Cellulose) nach der Methode von Rauterberg und Kühn (1968), zunächst zur Tripelhelix zu renaturieren und anschließend mit ATP zu Segmenten auszufällen. Schließlich sollte nach positiver Anfärbung mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat durch Vergleich elektronenmikroskopischer Aufnahmen eine Lokalisierung dieser Bruchstücke innerhalb des Kollagenmoleküls erfolgen (Versuch 15).

Dies erwies sich leider als in der Praxis nicht durchführbar. Lediglich CB1 und CB2 (Abb.39) ergaben Kristallite mit einem deutlichen Querstreifungsmuster; diese waren aber wegen symmetrischer Zusammenlagerungen für den gedachten Zweck nicht zu verwenden. Die symmetrischen Zusammenlagerungen können erklärt werden durch eine antiparallele Zusammenlagerung der Moleküle; die Überlappungszone der Endbereiche ist allerdings nicht definierbar.

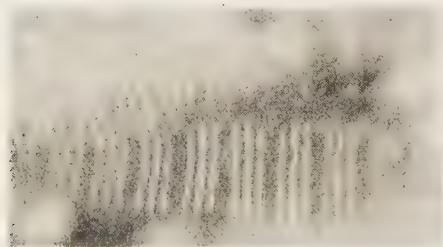


Abb. 39: EM-Aufnahme von SLS-Fragmenten von CB2
Elektronenoptische Vergrößerung 40.000:1

Jedoch ist folgende Feststellung möglich:

- a. Die Peptide lassen sich als SLS ausfällen. Die Kohlenhydrate behindern also offensichtlich weder die Renaturierung noch die Ausbildung der Segmente.
- b. Weder CB1 noch CB2 sind im Querstreifungsmuster CNBr-Peptiden entsprechender Größe der $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Kette von Kalbshautkollagen ähnlich.

IV. Immunologie der CNBr-Peptide

Das Ziel dieser Untersuchung war es, einen Vergleich der antigenen Eigenschaften der einzelnen CNBr-Peptide von Actinocol- α (PLK) durchzuführen und die so gewonnenen Ergebnisse mit ähnlichen Untersuchungen bei Vertebraten zu vergleichen. Weiterhin sollte versucht werden, den Bereich antigener Determinanten auf den CNBr-Peptiden einzuengen.

In einer früheren Arbeit (Hieber, 1970) war festgestellt worden, daß in Kaninchenantisera gegen Actinocol hauptsächlich Antikörper vorliegen, die sowohl mit SLK als auch mit PLK reagieren. Das steht im Gegensatz zu den mit Vertebratenkollagen erhaltenen Ergebnissen, wo eine sehr starke Antikörperantwort gegen proteaselabile Determinanten, also Strukturen im nichthelicalen Molekülteil, erfolgt. Daneben sind in den Kaninchenantisera gegen Actinocol in geringerer Konzentration Antikörper vorhanden, die mit Kaninchen- und Leberegelkollagen kreuzreagieren. (Diese können an entsprechenden Immunadsorbentssäulen entfernt werden).

Zur Charakterisierung von Kollagen-Antikörpern wurde die passive Hämagglutination angewendet (Versuch 17):

Für die Unterstützung bei der Durchführung der serologischen Tests danke ich Herrn Dr. Timpl.

a) Direkte Agglutination

Die Erythrozyten wurden tanniert und mit den zu vergleichenden Antigenen [α -Kette oder einzelne CNBr-Peptide der α -Kette von Actinocol (PLK)] beladen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe des Antiserums angefertigt und gegen die beladenen Erythrozyten titriert. Die letzte Verdünnung, bei der noch eine Agglutination zu beobachten war, wurde als reziproker Titer angegeben.

b) Inhibitionstechnik

Verschiedene Verdünnungen des Antiserums wurden mit konstanten Mengen an Antigenen, die als Inhibitoren fungieren, inkubiert. Dabei werden die Inhibitoren an die aktiven Zentren des Antikörpers gebunden. In der negativen Kontrolle wurde lediglich mit Puffer inkubiert. Nach Zusatz von Erythrozyten, die mit einem bestimmten Antigen beladen waren, konnte die Reduktion des Titors ermittelt werden. Diese Technik erlaubt den Vergleich von Antigenen auf stöchiometrischer Basis. Auch kleine Peptide, die man im Fall des Agglutinationstests nicht zur Sensibilisierung der Erythrozyten verwenden kann, können mit diesem Test untersucht werden.

1. Lokalisierung der Determinante

Für die serologischen Tests wurden drei verschiedene Kaninchenantiseren gegen Actinocol (SLK) verwendet, die zuvor an zwei Immunadsorbenssäulen (hergestellt mit Kaninchen- und Leberegelkollagen) von kreuzreagierenden Antikörpern befreit wurden (Versuch 16).

Wie aus Abb.40 ersichtlich ist, wird die Agglutination von Erythrozyten, die mit α -Ketten beladen sind, durch die α -Kette und das unfraktionierte CNBr-Peptidgemisch der α -Kette gleichmäßig stark inhibiert. Die einzelnen

CNBr-Peptide zeigten, in stöchiometrischen Konzentrationen zugegeben, eine geringere Inhibitionsaktivität.

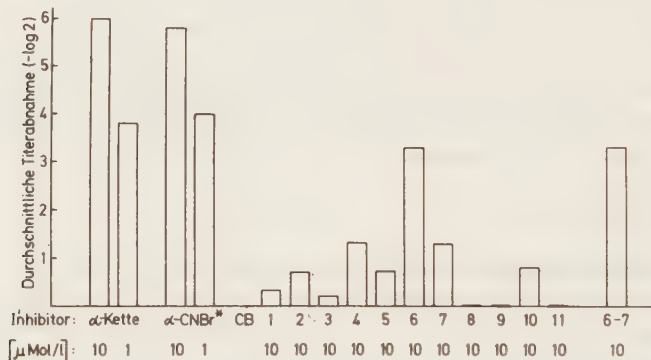


Abb. 40: Hämagglutination-Inhibition von Actinocol-Antikörpern durch die α -Kette und die CNBr-Peptide der α -Kette von Actinocol (PLK). Die Erythrozyten wurden mit Actinocol- α (PLK) sensibilisiert. Es werden die Durchschnittswerte von 3 verschiedenen Antiseren angegeben.

* Unfraktioniertes CNBr-Peptidgemisch von Actinocol- α (PLK)

Annähernd vergleichbar sind lediglich CB6 und CB6-7. Daß CB7 ganz wesentlich weniger inhibiert als CB6, ist ein weiterer Beleg für die Existenz des Doppelpeptids CB6-7 (vgl. Kap.III.8.). CB6-7 wurde getestet, da es bei der Isolierung der CNBr-Peptide von Actinocol- α (PLK) in größerer Menge als CB6 anfällt.

Für die geringere Titerabnahme durch die isolierten Peptide (CB6!), verglichen mit dem unfraktionierten CNBr-Peptidgemisch, können mehrere Gründe verantwortlich sein:

In Antiseren gegen Actinocol existieren möglicherweise Antikörper gegen antigene Determinanten an verschiedenen CNBr-Peptiden, die erst bei Vorhandensein aller CNBr-Peptide im

Inhibitions-gemisch voll gehemmt werden. Ebenso kann vermutet werden, daß im Actinocol methioninabhängige antigene Determinanten vorhanden sind. Diese entfalten natürlich nach CNBr-Spaltung in den Einzelpeptiden keine serologische Aktivität mehr; im Peptidgemisch liegen aber größere Mengen an ungespaltenen Peptiden vor, und damit auch möglicherweise intaktgebliebene methioninabhängige Determinanten.

Zur Unterstützung der Ergebnisse des Inhibitionstests wurde der Agglutinationstest durchgeführt (Tab.9).

Tab. 9: Agglutinationsaktivität von Antikörpern gegen Actinocol (SLK) gegenüber Erythrozyten, die mit der α -Kette und mit den CNBr-Peptiden von Actinocol (α -PLK) beladen wurden. Es werden die reziproken Titer angegeben.

Serum Nr.	Kette	CB1	CB2	CB3	CB4	CB6	CB6-7	CB7	CB8	CB9
202	2048	8	<4	<4	<4	256	256	<4	<4	16
203	1024	<4	<4	<4	<4	256	256	<4	<4	<4
204	4096	<4	<4	<4	<4	512	512	<4	<4	<4

CB5 wurde wegen Substanzmangel nicht geprüft.

Der Vergleich der Agglutinationsaktivität der α -Kette mit den größeren CNBr-Peptiden zeigte, daß lediglich CB6 und CB6-7 serologisch aktiv sind, aber vergleichbar zum Inhibitionstest einen geringeren Titer als die α -Kette haben.

Zur Prüfung der serologischen Spezifität der antigenen Determinanten auf CB6 diente der in Abb. 41 wiedergegebene Agglutinations-Inhibitionstest, bei dem Erythrozyten verwendet wurden, die mit CB6-7 beladen waren. CB6, CB6-7 und die α -Kette zeigten eine gleich starke Titerreduktion, alle anderen CNBr-Peptide inhibierten nur geringfügig. Das bedeutet, daß eine Reaktion mit CB6 spezifisch ist und die für diese Reaktion verantwortlichen antigenen Strukturen an keinem

weiteren Einzelpeptid vorhanden sind. Dagegen muß das Doppelpeptid CB6-7 ebenfalls diese antigenen Determinanten enthalten. Durch diese Ergebnisse kann jedoch nicht geklärt werden, ob eine oder mehrere antigenen Determinanten am CB6 vorliegen.

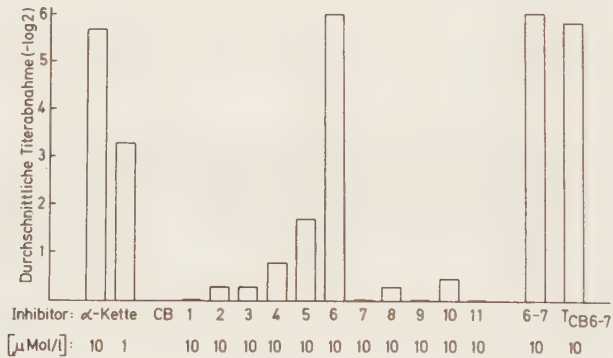


Abb. 41: Hämagglutination-Inhibition von Actinocol-Antikörpern durch die α -Kette, die CNBr-Peptide der α -Kette und das tryptische Peptid T_{CB6-7} von Actinocol (PLK). Die Erythrozyten wurden mit CB6-7 sensibilisiert. Es werden die Durchschnittswerte von 3 verschiedenen Antiseren angegeben.

2. Tryptische Spaltung von CB6-7 und Isolierung des serologisch aktiven Peptids.

Zur weiteren Charakterisierung der antigenen Determinante im CB6 wurde das Doppelpeptid CB6-7 verwendet. CB6-7 wurde mit Trypsin-TPCK im Enzym-Substratverhältnis 1:100 gespalten (Versuch 5). Die Chromatographie des tryptischen Abbaugesamtes an Bio-Gel P-10 ergab sieben Fraktionen (Abb.42).

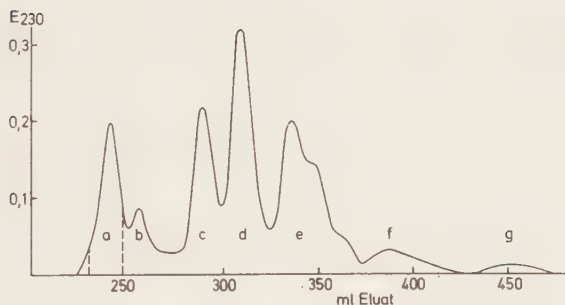


Abb. 42: Auftrennung der tryptischen Peptide von CB6-7 an Bio-Gel P-10.
Experimentelle Angaben siehe Versuch 7.3.

Fraktion a enthielt als einzige serologische Aktivität, wie durch Inhibitionstest festgestellt wurde, Die weitere Reinigung dieser Fraktion geschah an Phosphorcellulose. Peak a_1 wurde, wie in Abb. 43 angegeben, geschnitten.

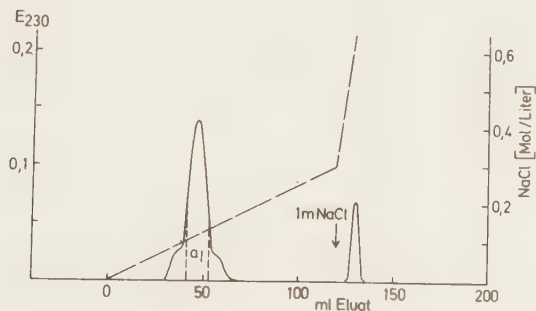


Abb. 43: Reinigung der Fraktion a (s. Abb. 42) an Phosphorcellulose.
Startpuffer: 0.001 m Natriumacetat (pH 3.6)
Limitpuffer: Startpuffer und 0.5 m Natriumchlorid
Gradient: Linearer Natriumchloridgradient
Gesamtvolumen: 200 ml
Weitere experimentelle Angaben siehe Versuch 6.2.

Das zugrundeliegende Peptid wurde T_{CB6-7} genannt. In der Hämagglutination-Inhibition zeigten CB6-7 und T_{CB6-7}, auf molarer Basis berechnet, die gleiche Titerreduktion (s. Abb. 41); das bedeutet, daß T_{CB6-7} alle antigenen Determinanten des CB6-7 enthält.

3. Charakterisierung des serologisch aktiven Peptids T_{CB6-7}.

In Tabelle 10 ist die Aminosäureanalyse von T_{CB6-7} wiedergegeben.

Tab. 10: Aminosäurezusammensetzung des tryptischen Peptids T_{CB6-7}.

Die Werte sind als Aminosäurereste pro Peptid angegeben. Werte unter 10 wurden exakt angegeben, Werte über 10 wurden zur nächsten ganzen Zahl ab bzw. aufgerundet.

Aminosäuren	T _{CB6-7}
3-Hyp	-
4-Hyp	3 (2.6)
Asp	5 (5.4)
Thr	3 (3.0)
Ser	1 (1.3)
Hse	-
Glu	4 (3.6)
Pro	7 (7.1)
Gly	19
Ala	6 (5.7)
Val	1 (0.8)
Met	1 (1.1)
Ile	1 (1.2)
Leu	1 (0.7)
Tyr	2 (2.0)
Phe	1 (1.3)
Hyl	-
His	-
Lys	3 (2.6)
Arg	-
Gesamt:	57

Das Molekulargewicht wurde an einer Bio-Gel P-10 Säule zu 5.400 bestimmt (s. Abb. 38). Das aufgrund der Aminosäureanalyse berechnete Molekulargewicht von 5103 steht damit in guter Übereinstimmung.

Die Aminosäureanalyse zeigt, daß im T_{CB6-7} die beiden einzigen in der α -Kette vorkommenden Tyrosinreste vereinigt sind. Es fehlt 3-Hyp, dagegen ist Methionin enthalten. Der Glycinwert läßt auf eine tripelhelicale Struktur des Peptids schließen.

DISKUSSION

1. Drei identische α -Ketten?

Zur Unterscheidung der beiden α -Kettenarten, die in den Kollagenen vom Typ A im Molverhältnis 2:1 vorliegen, haben sich in zahlreichen Untersuchungen anderer Arbeitskreise folgende Methoden als ausreichend erwiesen: Chromatographie der Kollagene an CM-Cellulose und ihre disk-elektrophoretische Analyse nach Reisfeld bzw. in Gegenwart von SDS. Piez (1965) konnte mit Hilfe der CM-Cellulose-Chromatographie sogar die drei Kettentypen des Kollagens der Kabeljauhaut trennen.

Nach allen drei Kriterien muß die α -Fraktion des Actinocols als einheitlich bezeichnet werden (Nordwig und Hayduk, 1969; Hieber, 1970; Ergebnisse der vorliegenden Dissertation). Diese Aussage hat inzwischen noch mehr Gewicht erhalten: Für die Knorpel- und Basalmembrankollagene - die aufgrund der drei genannten Untersuchungsmethoden gleichfalls aus drei identischen α -Ketten aufgebaut zu sein schienen - ist nämlich über den Weg der Isolierung und Charakterisierung der entsprechenden CNBr-Peptide der experimentelle Nachweis für die Richtigkeit dieser Interpretation geführt worden.

Diese, beim Actinocol noch vorhandene Lücke konnte mit der vorliegenden Untersuchung geschlossen werden. In Übereinstimmung mit dem Vorkommen von 10 Methioninresten im Actinocol wurden 11 CNBr-Peptide isoliert; ihre stöchiometrischen Verhältnisse, soweit untersuchbar, stehen mit der Annahme nur eines α -Kettentyps durchaus im Einklang. Die Summe ihrer Aminosäurereste stimmt quantitativ wie qualitativ innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen gut mit den Ergebnissen überein, die mit der reinen α -Fraktion erhalten wurden.

Folgende Argumente sprechen also für einen Molekülaufbau vom Typ $(\alpha)_3$ beim Actinocol und gegen eine Struktur $(\alpha)_2\alpha'$:

- a) Das Vorkommen von elf CNBr-Peptiden in (mit ausreichender Genauigkeit) äquimolaren Verhältnissen. Bestünde das Actinocolmolekül aus zwei verschiedenen α -Kettentypen im Verhältnis 2:1, müßte man entweder eine wesentlich größere Anzahl von CNBr-Peptiden erwarten (bei Stöchiometrieverhältnissen, die signifikant verschieden von den gefundenen sind) oder, zumindest, CNBr-Peptide mit höherem Molekulargewicht.
- b) Voraussetzung für solche Überlegungen ist natürlich, daß sich die beiden, eventuell vorhandenen α -Ketten in der Primärstruktur genügend unterscheiden. Da aber mit chromatographischen und elektrophoretischen Methoden keine Trennung in verschiedene Untereinheiten erreicht werden kann und auch die Isolierung der CNBr-Peptide keine Anhaltspunkte für eine derartige Heterogenität liefert, muß die Frage nach zwei in der Aminosäuresequenz sehr ähnlichen Ketten verneint werden.
- c) Der Einwand, daß mit Proteasen (Pepsin) behandeltes und daher verändertes Actinocol bei diesen Arbeiten verwendet wurde, ist zwar im Prinzip richtig; denn die nicht-helicalen Endbereiche des Moleküls (die bei der α 1-Kette des Kalbshautkollagens ca. 20 Aminosäurereste lang sind) werden, wie erwähnt, durch diese Vorbehandlung verkürzt. Die tatsächlichen Veränderungen müssen jedoch minimal sein, denn Actinocol (PLK) und Actinocol (SLK) sind nicht nur in der Disk-Elektrophorese und in der Aminosäureanalyse nicht unterscheidbar, sondern zeigen auch identisches chromatographisches (CM-Cellulose) und immunologisches Verhalten. Eine zweite, gegenüber Proteasen sehr labile α -Kette kann demnach ebenso ausgeschlossen werden.

- d) Die Identität der Aminosäurezusammensetzung der isolierten α -Fraktion mit derjenigen von unfractioniertem Actinocol (PLK) (Hieber, 1970) zeigt ferner, daß eine in der Aminosäurezusammensetzung unterschiedliche " α -Kette" der Untersuchung nicht dadurch entgangen ist, daß sie nur in kovalent gebundener dimerer, trimerer bzw. polymerer Form erscheint.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind also ausreichende Evidenz dafür, daß Actinocol in gleicher Weise wie Kollagen C, Kollagen S und Basalmembrankollagen aus identischen α -Ketten aufgebaut ist, sich aber bezüglich der Primärstruktur von diesen unterscheidet.

2. Vergleich mit anderen Kollagenarten

Die Gesamtzahl von 1030 Aminosäuren für alle CNBr-Peptide des Actinocols steht in guter Übereinstimmung mit der aufgrund von EM-Aufnahmen der Segmentstrukturen von Actinocol zu erwartenden Molekülgröße und mit den von Vertebratenkollagenen bekannten Ergebnissen (z.B. $\alpha 1$ -Kette von Kalbshautkollagen: 1052 Aminosäuren). Dies spricht erneut dafür, daß Pepsin nur eine geringfügige Veränderung an den Kollagenuntereinheiten bewirkt oder, genauer gesagt, nur eine minimale Kettenverkürzung verursacht. Das Molekulargewicht des Actinocols liegt zwar um etwa 10.000 Einheiten höher als bei den Kollagenen vom Typ A und C und um ca. 10.000 Einheiten niedriger als beim Basalmembrankollagen; jedoch ist das wegen der quantitativ verschiedenen Aminosäurezusammensetzungen der einzelnen Kollagene und wegen des sehr unterschiedlichen Kohlenhydratgehalts ohne weiteres verständlich.

Eine einfache Möglichkeit, den Verwandtschaftsgrad verschiedener Kollagenarten untereinander wenigstens näherungsweise zu bestimmen, besteht in einem Vergleich der die Aminosäuren

determinierenden Basen-Tripletts. Als Vorbild für diese Überlegungen dienten die Arbeiten von Rudall (1968) und Deasy (1972).

In Tabelle 11 sind für die α -Ketten von Actinocol (PLK) und Basalmembrankollagen, die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette von Rattenhautkollagen und die $\alpha 1(II)$ -Kette von Knorpelkollagen jeweils diejenigen Aminosäurereste aufaddiert, die durch Tripletts codiert werden, welche in der mittleren Position Cytosin (C), Adenin (A), Guanin (G) und Uracil (U) enthalten. (X kann dabei jedes beliebige Nukleotid sein, d.h. XCX kann UCU, aber auch UCG oder GCU bedeuten, etc.).

Tab. 11: Addition der Aminosäuren, die durch XCX, XAX, XGX und XUX codiert werden, für α -Ketten von verschiedenen Kollagenen (Reste/1000 Reste).

Kollagen	Codons			
	XCX (6)	XAX (7)	XGX (8)	XUX (9)
α -Kette aus Basalmembrankollagen (1)	299	206	395	133
$\alpha 1$ -Kette von Rattenhaut (2)	397	158	420	65
$\alpha 2$ -Kette von Rattenhaut (3)	358	157	426	102
$\alpha 1(II)$ -Kette von Knorpelkollagen (4)	373	172	408	75
α -Kette von Actinocol (PLK) (5)	306	210	435	90

Entsprechende Aminosäureanalysen siehe:

(1) Kefalides (1972); (2) Butler et al. (1967); (3) Fietzek und Piez (1969); (4) Miller (1971); (5) diese Arbeit.

Determiniert werden: (6) : Ser, Pro (3-Hyp, 4-Hyp), Thr, Ala
 (7) : Tyr, His, Glu, Asp, Lys (Hyl)
 (8) : Cys, Arg, Ser, Gly
 (9) : Phe, Leu, Ile, Met, Val

Die geringste Übereinstimmung in der Anzahl ähnlich codierter Aminosäuren ist so zwischen Actinocol und der $\alpha 1$ -Kette von Rattenhautkollagen festzustellen, eine verhältnismäßig gute Übereinstimmung zwischen Actinocol und Basalmembrankollagen. Deuten andere Ergebnisse dieser Arbeit in die gleiche Richtung?

Eine ähnlich große Anzahl an CNBr-Peptiden wie in Actinocol wird im Basalmembrankollagen, nämlich 12, und im Kollagen C, nämlich 13, gefunden. Da beim Actinocol (PLK) am C-Ende oder in der Nähe des C-Endes wahrscheinlich ein Methionin steht, sollte sich die Zahl der Peptide für das nichtenzymatisch behandelte Kollagen wohl auf 12 erhöhen. Homologien in Bezug auf die Aminosäureanzahl der einzelnen CNBr-Peptide sind fast ausschließlich im Vergleich zum Basalmembrankollagen festzustellen. Bei den anderen Kollagenarten zeigen höchstens zwei oder drei Peptide eine annähernd gleiche Anzahl an Aminosäureresten.

Mit Basalmembrankollagen hat Actinocol ferner einen erhöhten Gehalt an 3-Hyp gemeinsam. Bei beiden Kollagentypen scheint diese Aminosäure in bestimmten Bereichen des Moleküls bevorzugt vorzukommen.

Eine weitere Vergleichsmöglichkeit mit den CNBr-Peptiden anderer Kollagentypen besteht in dem Hydroxylierungsgrad des Prolins. (Es sei in Erinnerung gerufen, daß die Hydroxylierung ein genetisch nicht unmittelbar determinierter Vorgang ist).

Tabelle 12 zeigt, daß der Hydroxylierungsgrad bei vielen Peptiden zwischen 63 und 70% liegt. CB1 und CB6 weisen einen vergleichsweise niedrigen Wert auf (CB11 ist sogar Hyp-frei), wohingegen die Prolinreste im CB9 zu einem überdurchschnittlich hohen Prozentsatz hydroxyliert sind. Auch unter diesen Aspekten ist Basalmembrankollagen am ähnlichsten (Kefalides, 1972);

in dessen CNBr-Peptiden wurden vergleichbare Werte (60-75%) gefunden. Die Prolinhydroxylierungsrate in den meisten anderen Kollagenen liegt dagegen zwischen 40 und 50 %.

Tab. 12: Hydroxylierungsgrad des Prolins in den CNBr-Peptiden der α -Kette von Actinocol (PLK)

Peptide	$\frac{\text{Hyp} \cdot 100}{\text{Hyp} + \text{Pro}}$
CB1	51 %
CB2	68 %
CB3	69 %
CB4	70 %
CB5	63 %
CB6	50 %
CB7	65 %
CB8	67 %
CB9	82 %
CB10	67 %
CB11	-

Die Frage nach der Funktion des Hydroxyprolins und damit wahrscheinlich auch nach dem Grund der unterschiedlichen Hydroxylierung in den verschiedenen Kollagenarten kann nicht beantwortet werden. Möglicherweise hängt die höhere Hydroxylierung bei Actinocol sowie Basalmembrankollagen mit der Funktion dieser beiden Kollagene zusammen.

Überraschend niedrig ist der Gehalt an Pro und Hyp in CB6 (9.8 %, bezogen auf die Anzahl der Aminosäuren im Peptid), CB8 (11.1%) und CB11 (7.7%), während umgekehrt CB7 (27%) einen hohen Prozentsatz an diesen Aminosäuren aufweist. Der Durchschnittswert der anderen Peptide liegt bei 18%. Die durchgeführte Sequenzierung der α 1-Kette von Kalbshautkollagen erlaubt hierzu eine Vergleichsmöglichkeit. Die

Tripel-Helix dieser Kette endet am carboxyterminalen Ende mit der fünffachen Wiederholung des die tripelhelicale Struktur sehr stabilisierenden Triplets Gly-Pro-Pro oder Gly-Pro-Hyp (Fietzek et al., 1972). Die C-terminale Stellung von CB7 im Actinocol und sein, verglichen mit den anderen CNBr-Peptiden, hoher Gehalt an Pro und Hyp legen die Vermutung nahe, daß im Actinocol ähnlich wie im Kalbshautkollagen die tripelhelicale Struktur und damit auch die Widerstandsfähigkeit gegen proteolytischen Abbau am carboxyterminalen Ende durch eine Häufung der zuvor genannten Triplets gefestigt wird.

CB11 (13 Aminosäuren) enthält als einziges Peptid aus Actinocol- α (PLK) kein Hyp. $\alpha 1$ -CB1 und $\alpha 2$ -CB1 aus Kalbshautkollagen haben etwa die gleiche Aminosäureanzahl (19;14) und besitzen ebenfalls kein Hyp. Beide Peptide stehen in der genannten Reihenfolge N-terminal. Über die Stellung von CB11 innerhalb der α -Kette ist indes nichts bekannt.

In sämtlichen CNBr-Peptiden von Actinocol- α (PLK) wurde ein für die helicale Struktur erforderlicher Glycinwert ermittelt.

Die beiden einzigen Tyrosinreste und der einzige Histidinrest im Actinocol- α (PLK) wurden in CB6 gefunden. CB6 liegt dem wahrscheinlich C-terminalen CB7 benachbart. Bei den $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten des Kollagens von Kalbshaut (und einigen anderen Spezies), beim Knorpelkollagen (Miller, 1971) sowie beim Basalmembrankollagen tritt Tyrosin ebenfalls nur in sehr geringer Menge (2-4 Reste pro Kette) und bevorzugt in den Endbereichen des Moleküls auf. Ebenso ist in den CNBr-Peptiden der verschiedenen Kollagenarten Histidin häufig zusammen mit Tyrosin anzutreffen. Histidin hat durch die Arbeiten der Gruppe um Tanzer (Fairweather et al., 1972)

erhöhte Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da diese Aminosäure an der Stabilisierung von Quervernetzungen beteiligt ist. Die stabilisierte Quervernetzung entsteht wahrscheinlich durch Michael-Addition des Histidinrestes mit einer Aldol-Quervernetzung. Damit ergibt sich ein breites Feld für Spekulationen über die Art und Anzahl der Quervernetzungen auch im Actinocol. Denn obwohl nur ein Histidinrest pro Kette gefunden wurde, haben alle bisherigen Ergebnisse das Actinocol als ein sehr stark quervernetztes Kollagen ausgewiesen. Die Behandlung mit Pepsin, durch die wahrscheinlich Quervernetzungsgebiete an den Enden des Moleküls abgespalten werden, vermag nur einen Bruchteil des Actinocols zu α -Ketten aufzulösen. Vielleicht ist auch im Falle des Actinocol ein Hydroxylysinrest in näherer Nachbarschaft zum Histidinrest im CB6 Ausgangspunkt für eine Quervernetzung. Die Sequenzierung der $\alpha 1$ -Kette von Kalbshautkollagen zeigte tatsächlich, daß im $\alpha 1$ -CB5 und im $\alpha 1$ -CB6 jeweils Hydroxylysinreste in 3-Stellung zum Histidin vorhanden sind (Fietzek et al., 1972).

Actinocol unterscheidet sich von den bisher näher charakterisierten Kollagenen auch durch einen höheren Gehalt an basischen Aminosäuren. Ein gut abgrenzbarer Bereich im Actinocol, nämlich CB2, zeichnet sich durch einen stark erhöhten Gehalt an diesen Aminosäuren aus. Hier sind keine Parallelen mit den bisher untersuchten CNBr-Peptiden anderer Kollagenarten festzustellen.

Wie aus diesen Ausführungen zu entnehmen ist, kann ein Vergleich der CNBr-Peptide verschiedener Kollagenarten auf der Basis der qualitativen wie quantitativen Aminosäurezusammensetzung gewisse Homologien aufzeigen. Das Basalmembrankollagen scheint von den bisher bekannten Kollagentypen dem Actinocol

in der Evolution am nächsten zu stehen. Zum Kollagen A und C sind Parallelen zu erkennen, die über die Grundprinzipien des Bauschemas für das Kollagenmolekül hinausgehen. Aber erst die Sequenzierung definierter Molekülbereiche verschiedener Kollagentypen kann genaueren Aufschluss über die Evolution des Kollagens und die Stellung dieser Kollagene in der Evolutionsreihe geben. Die Voraussetzungen dazu sind für Actinocol jetzt gegeben.

3. Kohlenhydratverteilung und mögliche Funktion

Im Unterschied zum Kollagen A sind beim Actinocol die hydroxy-
lysin-gebundenen Kohlenhydrate beinahe über die gesamte Kette verteilt.

Lediglich CB4 und CB7 tragen keinen Kohlenhydratrest. CB7 steht wahrscheinlich C-terminal. Das läßt vermuten, daß ähnlich wie beim Kollagen A eine Glykosylierung am C-Ende der Peptidkette aus bisher unbekannten, strukturellen Gründen nicht erwünscht oder nicht möglich ist. Daher unterbleibt bereits eine Hydroxylierung des Lysins im CB7.

Die hohe Glykosylierungsrate im Actinocol wie auch im Basalmembrankollagen könnte ein Hinweis dafür sein, daß die Glykosyltransferasen eine weniger ausgeprägte Spezifität haben (in Bezug auf die Aminosäuresequenzen, die Hydroxylysin umgeben) als bisher angenommen wurde. Beim Basalmembrankollagen konnte Kefalides (1972) nachweisen, daß nicht, wie von einigen Autoren gefordert (vgl. Grant et al., 1972), die Gegenwart oder Abwesenheit von Arginin in der dritten Position nach Hydroxylysin darüber entscheidet, ob eine Glykosylierung stattfindet oder unterbleibt. Andererseits muß natürlich die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die Spezifität der Glykosyltransferasen in den verschiedenen Geweben unterschiedlich ist.

Vielleicht findet eine Glykosylierung an bestimmten Hydroxy-
lysinresten auch nur aus sterischen Gesichtspunkten, d.h.
aus "Platzmangel" nicht statt. So enthält z.B. CB4 einen
Hydroxylysinrest, der nicht glykosyliert ist. Die in Tabelle 8
zusammengefassten Ergebnisse zeigen ferner, daß ebenso in
CB1, CB3 und CB5 jeweils ein Hydroxylysinrest vorhanden ist,
der offenbar nicht glykosyliert werden kann.

Auf die Hydroxylysinreste bezogen, wurde eine Glykosylierungs-
rate von 84 % errechnet. Der weitaus größte Kohlenhy-
dratanteil wird von dem Disaccharid Glc-Gal-Hyl (90%) ge-
stellt; das steht im Gegensatz zum Kollagen A (53%) und
Kollagen C (59%), dagegen in Übereinstimmung mit dem Basal-
membrankollagen (94%). Außer im CB9 und CB10, wo 20 % bzw.
25 % des Kohlenhydratgehaltes als Gal-Hyl vorliegen, kommt
das Monosaccharid in allen andern Peptiden nur in geringer
Menge vor; wahrscheinlich ist es ein Artefakt, denn nach
Spiro (1967) entsteht Gal-Hyl bei der alkalischen Hydrolyse
zu ca. 5 % aus dem Disaccharid. Es kann daher angenommen wer-
den, daß das echte Vorkommen des Monosaccharids auf bestimmte
Molekülteile beschränkt ist, möglicherweise auch nur auf
gewisse Moleküle im Fibrillenverband (0.4 bzw. 0.2 Mole
Monosaccharid/Peptid).

Was kann aber nun der Sinn eines im Vergleich zu Kollagen A
sehr hohen Glykosylierungsgrades sein? Eine Antwort darauf
könnte mit der Funktion der beiden Kollagentypen zusammen-
hängen. Die Kollagene von Invertebraten haben eine noch wenig
differenzierte Funktion zu erfüllen, während bei hoch ent-
wickelten Tieren eine klare Trennung zwischen den Aufgaben
eines Stütz- bzw. Membrangewebes erfolgt ist. Stützgewebs-
kollagene sind in der Regeldichter gepackt als das Kollagen
in Membranen, die durchlässig und von lockerer Struktur sein

müssen. Die strukturelle Bedeutung der raumbeanspruchenden Kohlenhydratanteile könnte also in einer Beeinflussung der Quartärstruktur und Morphologie des Kollagens zu suchen sein. Diese Annahme kann durch den Befund gestützt werden, daß Kollagene mit einem geringen Kohlenhydratanteil dicke Fibrillen bilden, während Kollagene mit einem hohen Kohlenhydratanteil nur dünne Fibrillen zu bilden vermögen (Spiro, 1969).

4. Immunologie des Actinocols

Eine stark antigene Determinante im Actinocol konnte im CB6 lokalisiert werden. Im CB6 sowie im tryptischen Peptid T^{CB6-7}, das die antigene Determinante vollständig enthält, wurden auch die beiden einzigen in der α -Kette des Actinocols (PLK) vorkommenden Tyrosinreste nachgewiesen.

Im Säugetierkollagen kommt Tyrosin in nicht-helicalen Strukturen vor, die im Kaninchen eine sehr starke Antikörperantwort verursachen. Die Arbeitsgruppe um Timpl (Becker et al., 1972; Rauterberg et al., 1972; Furthmayr und Timpl, 1972) konnte nachweisen, daß Tyrosin Bestandteil dieser antigenen Determinanten ist. Daher liegt die Vermutung nahe, daß Tyrosin im Actinocol ebenfalls an der antigenen Determinante beteiligt ist. Weitere strukturelle Ähnlichkeiten sind jedoch sehr unwahrscheinlich, da beim Actinocol der antigene Bereich im helicalen Teil des Moleküls liegt, und zwar höchstens ca. 120 und mindestens ca. 70 Aminosäuren vom Carboxylende entfernt.

Eine Beteiligung von Mono- bzw. Disacchariden bei der Induzierung der Antikörperantwort - was bei dem hohen Kohlenhydratgehalt im Actinocol denkbar wäre - kommt dagegen sicher nicht in Frage, da im T^{CB6-7} kein Hydroxylysin gefunden wird.

EXPERIMENTELLER TEIL

Versuch 1

Präparation von Actinocol (PLK)

Lit.: Kühn et al. (1966); Nordwig et al. (1969); Hieber (1970)

Puffer: 0.05 m Citratpuffer (pH 3.7):
10.5 g Citronensäure werden in 100 ml 1 n Natron-
lauge und 50 ml 1 n Salzsäure gelöst; mit Aqua dest.
ad 1000 ml.

Kaliumchlorid-Phosphatpuffer:
500 g Kaliumchlorid und 7.12 g Dinatriumhydrogen-
phosphat-Dihydrat werden in 2 l Aqua dest. gelöst.

Vorreinigung:

Die von allen Pigmentschichten befreite und homö-
genisierte Mesolgoea von ungefähr 100 Actinien wird
dreimal mit 0.05 m Citratpuffer (pH 3.7) extrahiert.

Abbau mit Pepsin:

Der unlösliche Rückstand wird in 3 l 1%iger Essig-
säure suspendiert und 40 Std. bei 10°C unter stän-
digem Rühren mit Pepsin (p.A. der Fa. Merck, Darm-
stadt) im Verhältnis Kollagen:Pepsin = 100:1 inkubiert.

Isolierung:

Der Ansatz wird mit vorgekühlter 1%iger Essigsäure
auf 5 l verdünnt und bei 4°C und 23.300 g abzentri-
fugiert (Zentrifuge: Sorvall RC-2B der Fa. Sorvall
Inc., Rotortyp GSA). Der Überstand wird gegen den
frisch bereiteten Kaliumchlorid-Phosphatpuffer und
anschließend gegen Leitungswasser (4-5°C) dialysiert.
Das ausgefallene Actinocol (PLK) wird bei 23.300 g
(4°C) abzentrifugiert, anschließend über Nacht bei

4°C unter Rühren in 0.05 M Citratpuffer gelöst und wiederum gegen Kaliumchlorid-Phosphatpuffer und Leitungswasser dialysiert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis der Reinheitsfaktor 1.8 (N/4-Hyp) beträgt (Nordwig et al., 1969; siehe auch Versuch 9 und 10). Schließlich wird das gereinigte Actinocol (PLK) in 1 %iger Essigsäure gelöst.

Versuch 2

Reduktion des Actinocols (PLK) mit Natriumborhydrid

Puffer: 0.05 M Tris (pH 7.5) mit 1 M Calciumchlorid:
147.02 g Calciumchlorid und 6.05 g Tris werden in Aqua bidest. gelöst; mit Salzsäure wird pH 7.5 eingestellt. Mit Aqua bidest. ad 1000 ml. Dieser Puffer wird im folgenden kurz Tris-Calciumchloridpuffer genannt.

Das in 1%iger Essigsäure gelöste Actinocol (PLK) wird über Nacht im Kühlraum gegen Tris-Calciumchloridpuffer dialysiert und anschließend 10 min bei 26°C denaturiert.

Reduktion: Durch Zugabe von festem Tris wird pH 7.5 eingestellt. Die Lösung wird mit dem 100fachen molaren Überschuß an Natriumborhydrid (bezogen auf die Kollagenmenge) versetzt und 30 min auf dem Magnetrührer bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wird mit konzentrierter Essigsäure pH 3.5 eingestellt und 15 min bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend dialysiert man über Nacht gegen Tris-Calciumchloridpuffer oder stellt mit Tris pH 7.5 ein (für die anschließende Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel A-1.5 m).

Versuch 3

Vorbereitung für die Chromatographie von reduziertem Actinocol (PLK) an Bio-Gel A-1.5 m

Ca. 25 ml (ca. 50 mg) des in Tris-Calciumchloridpuffer vorliegenden, reduzierten Actinocols (PLK) werden 10 min bei 26°C denaturiert. Durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge werden unlösliche Anteile sedimentiert. Der Überstand wird auf die Säule aufgetragen (s. Versuch 7.5.b.).

Vorbereitung für die Rechromatographie der α -Fraktion an Bio-Gel A-1.5 m

Die nach Trennung an Bio-Gel A-1.5 m erhaltene α -Fraktion wird über Nacht gegen Aqua dest. bei 4°C dialysiert und anschließend am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 20°C auf ca. 10 ml eingengt und bei -18°C gelagert. Ungefähr 10 dieser α -Fraktionen werden vereinigt und gegen Aqua dest. bei 4°C über Nacht dialysiert. Dann wird auf ca. 25 ml einrotiert und über Nacht bei 4°C gegen Tris-Calciumchloridpuffer dialysiert. Diese Lösung wird in einer Tischzentrifuge 10 min zentrifugiert und der Überstand auf Bio-Gel A-1.5 m rechromatographiert, wie in Versuch 7.5.b. beschrieben. Mit der rechromatographierten α -Fraktion wird bezüglich der Konzentrierung in derselben Weise verfahren.

Versuch 4

CNBr-Spaltung

Lit.: Butler et al. (1967)

Vorbereitung: Die aus Versuch 3 erhaltenen Konzentrate der rechromatographierten α -Fraktionen werden für die Fälle a und b entsalzt (s. Versuch 7.1.2.) und anschließend gefriergetrocknet.

Spaltung mit CNBr

4.1. in Ameisensäure:

100 mg Actinocol- α (PLK) werden in 25 ml 70%iger Ameisensäure gelöst. Nach Zugabe des 15fachen molaren Überschusses an CNBr, bezogen auf die Methioninreste des gelösten Kollagens, wird die Lösung 4 Std. bei 30°C unter N₂ inkubiert. Anschließend wird mit einem ca. 5fachen Volumen an kaltem Aqua bidest. versetzt und lyophilisiert.

4.2. in Salzsäure:

100 mg Actinocol- α (PLK) werden in 25 ml 0.1 n Salzsäure gelöst. Die anderen Daten stimmen mit 4.1. überein. Vor der Gefriertrocknung wird an Bio-Gel P-2 entsalzt.

4.3. in 6 m Harnstoff:

20 - 50 ml Kollagenlösung (etwa 100 mg Protein) werden mit Harnstoff bis zu einer Konzentration von 6 m versetzt und mit Salzsäure auf pH 1.5 eingestellt. Die Spaltung mit CNBr erfolgt wie unter 4.1. beschrieben. Vor der Gefriertrocknung wird an Bio-Gel P-2 entsalzt.

Versuch 5

Trypsinspaltung von CB6-7

Trypsin, zweimal kristallisiert (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N.J., USA) wird zur Chymotrypsin-Inaktivierung mit TPCK = Tosylamido - 2-phenyläthyl-chlormethylketon, (Mann Research, N.J., USA) nach der Vorschrift von Kostka und Carpenter (1964) behandelt. Zur Bereitung der Enzymlösung wird 1 mg Trypsin in 1 ml 0.001 m Calciumchlorid gelöst. 10 mg CB6-7 werden in 5 ml 0.2 m Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7.8)

gelöst und mit 0.1 ml Trypsin-TPCK versetzt. Enzym-Substrat-verhältnis 1:100 (w/w). Das Reaktionsgemisch wird 4 Std. bei 37°C inkubiert. Der Abbau wird durch Ansäuern mit Essigsäure auf pH 4 gestoppt. Anschließend wird gefriergetrocknet.

Versuch 6

Ionenaustauscherchromatographie

Die Chromatographie wird aufsteigend durchgeführt. Das Eluat wird bei 230 mμ mit einem Beckman Spektralphotometer DB in einer Mikroküvette gemessen.

6.1. CM-Cellulose-Chromatographie

Lit.: Laboratory Manual der Fa. Whatman

Es wird CM-Cellulose (CM 52, microgranular, Fa. Whatman) verwendet.

6.1.1. Zur Homogenitäts- bzw. Heterogenitätsprüfung von Actinocol-α (PLK)

Säulenabmessungen: 1.7 x 7 cm

Säulentemperatur: 32°C

Startpuffer (pH 4.8): 0.02 m Kaliumacetat, 1 m Harnstoff

Limitpuffer (pH 4.8): 0.02 m Kaliumacetat, 1 m Harnstoff,
0.2 m Lithiumchlorid

Gradient: Linearer Lithiumchloridgradient,
400 ml Start- und 400 ml Limitpuffer

Durchflussgeschwindigkeit:

90 ml/h

Fraktionierung: 13 ml/Fraktion

Denaturierungsbedingungen:

10 min bei 40°C

Aufgetragene Menge Kollagen:

40 mg

6.1.2. Zur Trennung der CNBr-Peptide von Actinocol (PLK)

Säulenabmessungen: 2.5 x 15 cm
Säulentemperatur: 30°C
Startpuffer (pH 3.6): 0.02 m Natriumcitrat, 0.04 m Natriumchlorid
Limitpuffer (pH 3.6): 0.02 m Natriumcitrat, 0.14 m Natriumchlorid
Gradient: Linearer Natriumchloridgradient,
1000 ml Start- und 1000 ml Limitpuffer
Durchflussgeschwindigkeit:
120 ml/h
Fraktionierung: 12 ml/Fraktion
Denaturierungsbedingungen:
20 min bei 30°C
Aufgetragene Peptidmenge:
150 mg

6.1.3. Zur Trennung der CNBr-Peptide von Actinocol- α (PLK)

Säulenabmessungen: 0.85 x 3 cm
Säulentemperatur: 30°C
Startpuffer (pH 4.8): 0.02 m Natriumacetat
Limitpuffer (pH 4.8): 0.02 m Natriumacetat, unterschiedliche
Molaritäten an Natriumchlorid
Gradient: Linearer Natriumchloridgradient;
verschiedene Gradientenvolumina
Durchflussgeschwindigkeit:
20 - 25 ml/h
Fraktionierung: 6 ml/Fraktion
Denaturierungsbedingungen:
10 min bei 30°C
Aufgetragene Peptidmenge:
Höchstens 5 mg

6.2. Phosphorcellulose-Chromatographie

Es wird Phosphorcellulose (P-11, Fa. Whatman) verwendet.

- Säulenabmessung: 0.85 x 3 cm
Säulentemperatur: 30°C
Startpuffer: Es werden 2 verschiedene Startpuffer verwendet.
a) 0.001 m Natriumacetat, pH 3.6
b) 0.002 m Natriumacetat, pH 4.8
Limitpuffer: Es werden Limitpuffer zu a) bzw. b) mit unterschiedlichen Natriumchloridkonzentrationen verwendet.
Gradient: Linearer Natriumchloridgradient.
Es werden verschiedene Gradientenvolumina verwendet.
Durchflussgeschwindigkeit: 20 - 25 ml/h
Fraktionierung: 6 ml/Fraktion
Denaturierungsbedingungen: 10 min bei 30°C
Aufgetragene Peptidmenge: Höchstens 5 mg

Versuch 7

Gelchromatographie

Lit.: Vorschrift der Fa. Bio-Rad

Die Chromatographie wird absteigend durchgeführt. Das Eluat wird bei 230 mμ mit einem Beckman Spektralphotometer DB in einer Mikroküvette gemessen.

Wenn nicht anders angegeben, wird die Säule nicht thermostatisiert.

7.1. Bio-Gel P-2 (100-200 mesh), Fa. Bio-Rad

7.1.1. Zum Äquilibrieren für die Ionenaustauscherchromatographie

Säulenabmessungen: 2 x 25 cm

Elutionsmittel: Startpuffer der Ionenaustauscherchromatographie

Durchflussgeschwindigkeit:
60 ml/h

Vorbereitung der Probe:

Nach Gefriertrocknung in wenig Aquabidest. lösen

7.1.2. Zum Entsalzen

Säulenabmessungen: 4.5 x 40 cm (bei Peptidmengen unter etwa 10 mg, Säule wie bei 7.1.1.)

Elutionsmittel: 0.1 n Essigsäure

Durchflussgeschwindigkeit:
160 ml/h

7.2. Bio-Gel P-4 (200-400 mesh), Fa. Bio-Rad

Säulenabmessungen: 3.7 x 135 cm

Elutionsmittel: 0.1 n Essigsäure

Durchflussgeschwindigkeit:
35 ml/h

Denaturierungsbedingungen:

10 min bei 30°C

Aufgetragene Peptidmenge:

ca. 100 mg

7.3. Bio-Gel P-10 (200-400 mesh), Fa. Bio-Rad

Säulenabmessungen: 2.5 x 95 cm

Elutionsmittel: 0.05 m Natriumacetat, pH 4.5

Durchflussgeschwindigkeit:
13 ml/h

Fraktionierung: 3 ml/Fraktion

Denaturierungsbedingungen:

10 min bei 30°C

Aufgetragene Peptidmenge:

bis 30 mg

7.4. Bio-Gel P-150 (200-400 mesh), Fa. Bio-Rad

Säulenabmessungen: 2.8 x 105 cm

Säulentemperatur: 30°C

Elutionsmittel: 0.05 m Natriumacetat, pH 4.5

Durchflussgeschwindigkeit:

24 ml/h

Fraktionierung: 6 ml/Fraktion

Denaturierungsbedingungen:

10 min bei 30°C

Aufgetragene Peptidmenge:

bis 70 mg

7.5. Bio-Gel A-1.5 m (200-400 mesh), Fa. Bio-Rad

Säulenabmessungen: a) für analytische Zwecke

1.7 x 220 cm

b) für präparative Zwecke

3.3 x 140 cm

Elutionsmittel: 0.05 m Tris, 1 m Calciumchlorid,
mit Salzsäure auf pH 7.5 eingestellt

Durchflussgeschwindigkeit:

a) 9 ml/h

b) 45 ml/h

Fraktionierung: a) 3 ml/Fraktion

b) 11 ml/Fraktion

Denaturierungsbedingungen:

für Actinocol: 10 min bei 26°C

für Kalbshautkollagen: 10 min. bei 35°C

Aufgetragene Peptidmenge:

a) 5 mg

b) je nach Viskosität sind in 25 ml der
Auftragslösung 35 - 120 mg Kollagen
enthalten.

Versuch 8

Molekulargewichtsbestimmung am Molekularsieb

Lit.: Piez (1968b)

Die Molekulargewichtsbestimmungen werden an Bio-Gel P-10, Bio-Gel P-150 und Bio-Gel A-1.5 m durchgeführt. Die experimentellen Angaben stimmen mit denen zu Versuch 7.3., 7.4. und 7.5. überein. Lediglich die aufgetragene Peptidmenge ändert sich und beträgt bei der Chromatographie an Bio-Gel P-10 ca. 3 mg in 1 ml Elutionsmittel und an Bio-Gel P-150 1-5 mg in 1 ml Elutionsmittel.

Bestimmung des Totalvolumens (V_t):

Der Auftragslösung wird 1 Tropfen tritiiertes Wasser zugegeben. Zur Scintillationsmessung werden den eluierten Fraktionen Aliquote entnommen.

Totalvolumen (V_t): Bio-Gel P-10 : 457 ml
Bio-Gel P-150 : 698 ml
Bio-Gel A-1.5m: 527 ml

Versuch 9

Hydroxyprolinbestimmung

Es wurde die Vorschrift von Stegemann (1967), modifiziert von Hurych und Chvapil (1963) übernommen.

Versuch 10

Stickstoffbestimmung

Es wurde die von Strauch (1965) modifizierte Kjeldahl-Methode angewendet.

Versuch 11

Hydrolysebedingungen für die quantitative Aminosäureanalyse

0.1 - 0.5 mg Protein werden mit 1 ml einer 6 n Salzsäure, die

Über Zinn (II)chlorid destilliert wird, unter Stickstoff 24 Std. hydrolysiert. Bei Anwesenheit von Methionin wird Mercaptoäthanol (Salzsäure : Mercaptoäthanol = 2000:1, .v/v) zugegeben. Nach der Hydrolyse wird die Probe zur Trockene eingeeengt und bei Anwesenheit von Homoserin kurz vor dem Auftrag auf den AS-Analysator eine Stunde bei 37°C mit 0.5 ml 1 n Piperidin inkubiert, das sodann am Rotationsverdampfer entfernt wird.

Versuch 12

Alkalische Hydrolyse zur quantitativen Bestimmung von Glc-Gal-Hyl, Gal-Hyl und freiem Hyl

Lit.: Stemberger (1972)

0.1 - 1 mg Protein werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß, dessen Deckel mit Löchern versehen ist, mit 0.5 ml einer 2 n Natronlauge versetzt. Das Tube wird in ein mit 0.5 ml einer 2 n Natronlauge gefülltem Reagenzglas unter Stickstoff eingeschmolzen und das Protein 24 Std. bei 100°C hydrolysiert. Anschließend wird mit Salzsäure neutralisiert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt.

Zum Kalibrieren des Aminosäureanalysators werden geringe Mengen des Disaccharids und des Monosaccharids benötigt. Hierzu werden zweimal je 1 mg Actinocol (PLK') nach der obigen Vorschrift alkalisch hydrolysiert, neutralisiert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Eine Probe wird nach Zugabe von 0.5 ml einer 0.1 n Salzsäure in einem zugeschmolzenen Reagenzglas 18 Std. bei 100°C hydrolysiert und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Weitere experimentelle Bedingungen s. Versuch 13.

Versuch 13

Bedingungen für den Aminosäureanalysator

Apparat: Es wird ein automatischer Analysator BC 200 der Fa. Bio-Cal, gekoppelt mit einem automatischen Probenaufgeber der Fa. Beckman, verwendet.

Chromatographie-Bedingungen: Als Säulenfüllung dient das sphärische Kationenaustauscherharz der Fa. Bio-Rad. Eluiert wird mit Natriumcitratpuffern. Nach der Methode von Spackmann et al. (1958) wird mit einem Stufengradienten im Einsäulenverfahren gearbeitet.

Pufferfolge:

	A	B	C	D
pH	3.0	3.25	4.25	6.1
Normalität (Na-Ionen)	0.2	0.2	0.2	0.35
Laufzeit (min)	0-11.5	11.5-76	76-113 (76-170)	113-260 (170-290)
Temp. °C	38	38	53	53

Zur Trennung von Phe und Gal-Hyl gelten die in Klammern angegebenen Laufzeiten der Puffer C und D.

Auftragsmenge: Die Mindestpeptidmenge beträgt bei Verwendung der Mikroküvette 100 µg.

Auswertung: Die Analyse eines in seiner Zusammensetzung bekannten Testgemisches wird zur Auswertung benötigt.

a) Quantitative Aminosäureanalyse

Da 3-Hyp nicht im Testgemisch vorhanden ist, erfolgt die Berechnung dieser Aminosäure

mit Hilfe des von Piez et al. (1963) angegebenen Anfärbefaktors.

- b) Berechnung von Glc-Gal-Hyl, Gal-Hyl und freiem Hyl.

Neben den Ergebnissen der alkalischen Hydrolyse werden die Gesamtmoles Hyl nach saurer Hydrolyse benötigt.

$$\% \text{ freies Hyl} = \frac{M \cdot a}{a+b+c} \cdot 100$$

$$\% \text{ Gal-Hyl} = \frac{M \cdot b}{a+b+c} \cdot 100$$

$$\% \text{ Glc-Gal-Hyl} = \frac{M \cdot c}{a+b+c} \cdot 100$$

M bedeutet Mole Hyl nach saurer Hydrolyse.

Aufgrund der alkalischen Hydrolyse werden

(a) (Mole Hyl frei)

(b) (Mole Gal-Hyl)

(c) (Mole Glc-Gal-Hyl) ermittelt.

Für die Berechnung von Gal-Hyl (b) und Glc-Gal-Hyl (c) wird der Anfärbefaktor des freien Hyl verwendet (Spiro, 1967).

Versuch 14

SDS-Disk-Elektrophorese

Lit.: Laemmli (1970).

Lösungen für die Herstellung des Sammel- und Trenngels:

- I. a) 30 g Acrylamid

0.8 g N-N'-Methylenbisacrylamid

mit Aqua bidest. ad 100 ml

- I. b) 40 g Acrylamid

1.06 g N-N'-Methylenbisacrylamid

mit Aqua bidest. ad 100 ml

- II. 200 mg SDS (Dodecylsulfat, Na-Salz, reinst, salzfrei;
Serva, Heidelberg)
9.08 g Tris
0.05 ml TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin)
mit Salzsäure auf pH 8.8 einstellen und mit Aqua bidest.
auf 100 ml.
- III. 200 mg SDS
3.03 g Tris
0.05 ml TEMED
mit Salzsäure auf pH 6.8 einstellen und mit Aqua bidest.
ad 100 ml.
- IV. 1.05 g Ammoniumperoxydisulfat mit Aqua bidest. ad 50 ml.
Lösung IV ist nur einen Tag haltbar.

Bereitung der Gele

Trenngel: Bei Zugabe von Lösung Ia erhält man ein an Acryl-
amid 7.5%iges Gel, mit Ib ein 10%iges Gel.

7.5 ml von Ia bzw. Ib

15 ml von II

1 ml von IV

6.5 ml H₂O

Die Lösungen müssen zuvor evakuiert werden.

Sammelgel: 3%ig an Acrylamid

1 ml von Ia

5 ml von III

0.33 ml von IV

3.67 ml H₂O

Die Lösungen müssen zuvor evakuiert werden.

Das Trenngel soll in den Glasröhrchen (0.5 cm x 13.5 cm)
eine Höhe von 10 cm, das Sammelgel eine Höhe von 1 cm
erreichen. Das Trenngel wird zum Erhalt einer planaren

Oberfläche mit Aqua bidest. überschichtet. Die Polymerisation erfolgt bei Tageslicht.

Elektrodenpuffer: 12.1 g Tris
(Vorratslösung) 57.5 g Glycin
4.0 g SDS
Mit Aqua bidest. ad 1000 ml.

Für den Gebrauch werden 1 Teil des Elektrodenpuffers und 3 Teile Aqua bidest. vermischt. Die Lösung soll pH 8.3 haben.

Auftragspuffer: 1 g SDS
24 g Harnstoff
0.6 g Tris
mit Aqua bidest. ad 50 ml.

Aufgetragene Proteinmenge:
30-40 µg werden in 0.02 - 0.1 ml des Auftragspuffers gelöst.

Denaturierungsbedingungen:
30 min bei 35°C

Färbelösung: 1.25 g Coomassie Brilliant Blue R-250
454 ml 50% Methanol
56 ml Eisessig
Die Lösung wird filtriert. Die Gele werden
20 min gefärbt.

Entfärben: Über Nacht in 7%iger Essigsäure

Trennstrom und 1 Std. bei 1 mA pro Röhrchen, anschließend
Trenndauer: 2.5 Std. bei 2.2 mA pro Röhrchen

Laufrichtung: von (-) nach (+)

Apparat: Diskkammer mit Kühlmantel der Fa. Desaga.
Es wird mit fließendem Leitungswasser gekühlt.

Versuch 15

Renaturierung und Elektronenmikroskopie

Lit.: Rauterberg und Kühn (1968)

Puffer: 0.25 m Citratpuffer (pH 3.7),
31.51 g Citronensäure p.A. und
22.02 g Trinatriumcitrat-Dihydrat werden in Aqua
bidest. gelöst. Der pH-Wert wird mit gesättigter
Citronensäurelösung eingestellt. Mit Aqua bidest.
ad 1000 ml.

Renaturierung:

Ca. 50 µg des Peptids werden in einem Tropfen
0.25 m Citratpuffer, pH 3.7, gelöst und nach Denaturierung 4 Tage lang wechselweise bei 9°C und 12°C
belassen. Anschließend wird die Lösung 4 Tage lang
bei 4°C aufbewahrt.

Vorbereitung für die EM-Aufnahme

Die Lösung mit den renaturierten Peptiden wird auf das dreifache Volumen verdünnt und 14 Std. bei 4°C gegen eine 0.4%ige ATP-Lösung (in 0.5%iger Essigsäure) dialysiert (ATP-Adenosin-5'-triphosphat, Na₂-Salz, krist.; ADP 5%, Fa. Serva, Heidelberg). Nach Aufbringung der Segmentsuspension auf einen Objektträger (7-Loch-Blende bedeckt mit einem Kollodium-Kohlefilm) wird 12-15 min angefärbt mit 0.5%iger Phosphorwolframsäure, pH 3.5, mehrmals gewaschen und mit 1%iger Uranylacetatlösung 10 min nachkontrastiert. Die negative Anfärbung wird mit 4%iger Phosphorwolframsäure, pH 7, durchgeführt.

Apparat: Die EM-Aufnahmen werden am Elmiskop I der Fa. Siemens und Halske, Berlin durchgeführt. Die Strahlenspannung beträgt 80 kV, die Vergrößerung 40.000:1.

Versuch 16

Bereitung der Antiseren

Die Kaninchen werden mit jeweils 5 mg Actinocol (SLK) insgesamt vier- oder sechsmal im Abstand von 14 Tagen immunisiert. Die Immunisierung erfolgt abwechselnd intraperitoneal ohne Adjuvans und subkutan mit Adjuvans. Im letzteren Fall wird die Kollagenlösung mit dem gleichen Volumen an Freund'schen Adjuvans vermischt.

Zur Prüfung des Titers wird Blut aus der Ohrvene entnommen. Die Tiere werden unter Evipan-Narkose durch Herzpunktion entblutet.

Die Antiseren werden über zwei Immunadsorbentssäulen geschickt, die a) mit denaturiertem Kaninchenkollagen und b) mit denaturiertem Leberegelkollagen beladen sind. Das durchgelaufene Volumen wird nach Ammonsulfatfällung auf das ursprüngliche Volumen gebracht (Timpl et al., 1968). Die so absorbierten Antiseren werden bei -20°C gelagert.

Versuch 17

Passive Hämagglutination

Zum Nachweis der Kollagen-Antikörper wird der passive Hämagglutinationstest nach Stavitsky (1954), modifiziert von Steffen et al. (1968) angewendet.

Es werden Vorratslösungen des Antigens in 2 m Kaliumrhodanid (10 mg/ml) hergestellt. Aliquote von diesen werden mit phosphatgepufferter 0.15 m Natriumchloridlösung (pH 6.4) im Verhältnis 1:200 verdünnt und mit dem gleichen Volumen einer 2.5%igen Suspension tannierter Erythrozyten vermischt. Nach 10 min wird das nicht gebundene Antigen ausgewaschen. Für die folgenden Tests wird eine 2.5%ige Suspension der beladenen Erythrozyten hergestellt.

17.1. Agglutinationstest

Es wird eine geometrische Verdünnungsreihe des Antiserums in 0.15 m Natriumchloridlösung hergestellt. Davon werden jeweils 2 Tropfen, beginnend mit der größten Verdünnung, mittels Pasteurpipetten auf gefelderte Glasplatten gebracht. Es wird anschließend je 1 Tropfen der sensibilisierten Erythrozytenlösung hinzugegeben. Die Reaktionspartner werden durch Schwenken der Platte vermischt. Nach 8 min wird die Agglutination abgelesen. Als Titer wird der reziproke Wert derjenigen Serumverdünnung angegeben, die gerade noch eine Agglutination zeigt. Als Kontrolle dienen nicht-beladene Erythrozyten.

17.2. Inhibitionstest

Die Inhibitorpeptide werden in 0.05%iger Essigsäure gelöst. Diese Lösung wird mit 0.2 Volumenanteilen einer 0.9 m Natriumchlorid/0.15 m Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung neutralisiert. Die Endkonzentration der Inhibitorpeptide soll 1 bzw. 10 $\mu\text{mol/l}$ betragen. Zum Test werden je ein Tropfen der Antiserumverdünnung und der Inhibitorlösung vermischt und nach 3 min mit der Erythrozytensuspension versetzt.

Nach 8 min wird abgelesen. Die Inhibitionsaktivität ergibt sich aus der Titerdifferenz zum Agglutinationstiter ohne Inhibitor.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziele, durch Isolierung und Charakterisierung der Bromcyanpeptide des Seeanemonenkollagens (Actinocol) eine definitive Aussage über seinen Molekülaufbau zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, daß die bereits aus anderen experimentellen Kriterien geschlossene Struktur (drei identische α -Ketten) mit größter Wahrscheinlichkeit tatsächlich vorliegt.

Folgende Ergebnisse wurden im einzelnen erhalten:

1. Es wurden Methoden entwickelt, die es gestatten, Ausgangsmaterial in den für präparatives Arbeiten nötigen Mengen zu gewinnen.

Säurelösliches Kollagen fällt in zu geringer Menge an, und Versuche die Ausbeute zu erhöhen schlugen fehl. Deswegen wurde die Mesogloea durch Pepsinabbau in Lösung gebracht; es ist bekannt, daß das Molekül bzw. die α -Ketten bei diesem Verfahren nur um sehr kleine Endbereiche verkürzt werden.

Durch Gelchromatographie wurde die α -Fraktion isoliert. Dabei mußten Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, um das Protein nicht durch Quervernetzungen unlöslich werden zu lassen.

2. Die so gewonnene α -Fraktion war nach den Kriterien der CM-Cellulose-Chromatographie und der SDS-Disk-Elektrophorese vollkommen einheitlich.

3. Die α -Fraktion wurde in Gegenwart von 6 m Harnstoff mit Bromcyan behandelt, wobei die Peptidketten an den Methioninresten gespalten werden.

Durch Kombination von säulenchromatographischen Trennungen an Molekularsieben verschiedenen Vernetzungsgrades sowie an

CM-Cellulose- und Phosphorcellulose-Ionenaustauschern (vgl. Abb.10) konnten insgesamt elf Fragmente der α -Kette (sog. CNBr-Peptide) isoliert werden.

Die elf CNBr-Peptide waren einheitlich. Ihre Aminosäurezusammensetzung und ihr Molekulargewicht wurden bestimmt. Innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen wurde für beide Größen eine gute Übereinstimmung zwischen der α -Fraktion und der Summe aus den elf Peptiden gefunden.

4. In einer eigenen Versuchsreihe wurden die stöchiometrischen Verhältnisse von acht der elf CNBr-Peptide bestimmt. Sie sind im Einklang mit der Annahme, daß Actinocol aus drei identischen α -Ketten besteht. Damit dürfte am Modell des Actinocols - dem biologisch "ältesten" der bisher untersuchten Kollagene - nachgewiesen sein, daß es ursprünglich nur ein Gen für die Determinierung der Kollagen- α -Ketten gab.

5. Der Vergleich mit Kollagenen höher entwickelter Tiere zeigt völlige Übereinstimmung bei den Eigenschaften, welche die höheren Strukturen bestimmen. Zu den interessanten Unterschieden gehört ein wesentlich höherer Gehalt des Actinocols an kovalent gebundener Glucose und Galactose. Es konnte gezeigt werden, daß der weit überwiegende Teil davon in Form des Disaccharids Hyl-Gal-Glc vorliegt; die Verteilung des Kohlenhydratanteils auf die einzelnen CNBr-Peptide, also auf die α -Kette, wurde ebenfalls bestimmt.

6. Die offenbar einzige antigene Determinante des Actinocols ist in der Nähe des C-terminalen Kettenendes lokalisiert, und zwar bemerkenswerterweise in einem Bereich, der im Molekül helical ist. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Antikörperantwort im Kaninchen, ähnlich wie bei Vertebratenkollagenen, durch tyrosinhaltige Sequenzen induziert wird.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Bailey, A.J., C.M.Peach, L.J.Fowler, Biochem.J. 117, 819(1970)
- Bailey, A.J., FEBS Letters, 18, 154 (1971)
- Becker, U., R.Timpl, K.Kühn, Eur.J.Biochem. 28, 221 (1972)
- Bornstein, P., A.H.Kang, K.A.Piez, Biochemistry 2, 3803 (1966a)
- Bornstein, P., K.A.Piez, Science 148, 1353 (1966b)
- Bornstein, P., K.A.Piez, Biochemistry 2, 3460 (1966c)
- Butler, W.T., K.A. Piez, P.Bornstein, Biochemistry 6, 3771 (1967)
- Deasy, C.L., Biochim.Biophys.Acta 278, 142 (1972)
- Deshmukh, K., M.E.Nimni, J.Biol.Chem. 244, 1787 (1969)
- Eyre, D.R., M.J. Glimcher, Biochim.Biophys.Acta 243, 525(1971)
- Fairweather, R.B., M.L.Tanzer, P.M.Gallo, Biochem.Biophys.
Research Com. 48, 1311 (1972)
- Fietzek, P., K.A. Piez, Biochemistry 8, 2129 (1969)
- Fietzek, P., F.W.Rexrodt, P.Wendt, M.Stark, K.Kühn, Eur.J.
Biochem. 30, 163 (1972)
- Furthmayr, H., R.Timpl, Biochem.Biophys.Research Com.47, 944(1972)
- Grant, M.E., D.J.Prockop, New England Journal of Medicine
286, 194, 242, 291 (1972)
- Hieber, E., Diss.Univ.München (1970)
- Hurych, J., M.Chvapil, Kozarstvi 12, 317 (1962)
Ref. in Collagen Currents 4, 3 (1963)
- Kefalides, N.A., Biochem.Biophys.Research Com. 47, 1151(1972)
- Keutmann, H.T., J.T.Potts, Anal.Biochem. 29, 175 (1969)
- Kostka, V., F.M.Carpenter, J.Biol.Chem. 239, 1759 (1964)

- Kühn, K., in "Essays in Biochemistry", Vol.5 (Campbell, P.N.; Greville, G.D., Herausgeb.), Acad. Press, London und New York (1969), S.59
- Kühn, K., F.Pietrek, J.Kühn, Biochem.Z. 344, 418 (1966)
- Laemmli, U.K., Nature 227, 680 (1970)
- Mechanic G., M.L.Tanzer, Biochem.Biophys.Research Com. 41, 1597 (1970)
- Miller, E.J., V.J.Matukas, Proc.Natn.Acad.Sci. 64, 1264 (1969)
- Miller, E.J., Biochemistry 10, 3030 (1971)
- Miller, E.J., F.E.Epstein, K.A.Piez, Biochem.Biophys. Research Com. 42, 1024, (1971)
- Müller, P.K., E.Mc Goodwin, G.R.Martin, Biochem.Biophys. Research Com. 44, 110 (1971)
- Nordwig, A., U.Hayduk, J.Mol.Biol. 26, 351 (1967)
- Nordwig, A., U.Hayduk, J.Mol.Biol. 44, 161 (1969)
- Nordwig, A., E.Regall, U.Hayduk in "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix", herausg. von E.A.Balazs, Vol. 1, 27 (1970)
- Piez, K.A., M.S.Lewis, G.R.Martin, J.Gross, Biochim.Biophys. Acta 22, 596 (1961)
- Piez, K.A., E.A.Signer, M.S.Lewis, Biochemistry 2, 58 (1963)
- Piez, K.A., Biochemistry 4, 2590 (1965)
- Piez, K.A., Ann.Rev.Biochem. 37, 547 (1968a)
- Piez, K.A., Anal.Biochem. 26, 305 (1968b)
- Piez, K.A., E.J.Miller, J.M.Lane, Biochem.Biophys.Research Com. 37, 801 (1969)

- Pikkarainen, J., E.Kulonen, Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl. 25, 40 (1967)
- Pikkarainen, J., E.Kulonen, Nature 233, 839 (1969)
- Ramachandran, G.N., G.Kartha, Nature 176, 593 (1955)
- Rauterberg, J., K.Kühn, FEBS Letters 1, 230 (1968)
- Rauterberg, J., K.Kühn, Eur.J.Biochem. 19, 398 (1971)
- Rauterberg, J., R.Timpl, H.Furthmayr, Eur.J.Biochem. 27, 231 (1972)
- Rich, A., F.H.C. Crick, Nature 176, 915 (1955)
- Rich, A., F.H.C.Crick, J.Mol.Biol. 3, 483 (1961)
- Rudall, K.M., in "Treatise on Collagen", Vol.2 A (Gould, B.S., Herausgb.), Acad.Press, New York (1968) S. 83
- Spackman, D.H., W.H.Stein, S.Moore, Anal.Chem. 30, 1190 (1958)
- Spiro, R.G., J.Biol.Chem. 242, 4813 (1967)
- Spiro, R.G., J.Biol.Chem. 244, 602 (1969)
- Spiro, R.G., Ann.Rev.Biochem. 39, 599 (1970)
- Spiro, R.G., M.J.Spiro, J.Biol.Chem. 246, 4899 (1971a)
- Spiro, R.G., M.J.Spiro, J.Biol.Chem. 246, 4910 (1971b)
- Spiro, R.G., M.J.Spiro, J.Biol.Chem. 246, 4919 (1971c)
- Stark, M., E.J.Miller, K.Kühn, Eur.J.Biochem. 27, 192 (1972)
- Stavitsky, A.B., J.Immunol. 72, 360 (1954)
- Steffen, C., R.Timpl, I.Wolff, Immunology 15, 135 (1968)
- Stegemann, H., J.Physiol.Chem. 311, 41 (1958)
- Stemberger, A., Diss.Univ.München (1972)
- Strauch, L., Z.Klin.Chem. 3, 165 (1965)
- Timpl, R., J.Wolff, H.Furthmayr, C.Steffen, Immunology 15, 145 (1968)

Wendt, P., K.v.d.Mark, F.Rexrodt, K.Kühn, Eur.J.Biochem.
30, 169 (1972)

Yonath, A., W.Traub, J.Mol.Biol. 43, 461 (1969)

Zimmermann, B.K., J.Pikkarainen, P.P.Fietzek, K.Kühn,
Eur.J.Biochem. 16, 217 (1970)

L E B E N S L A U F

Am 6.4.1943 wurde ich als Sohn des Prokuristen Werner Nowack und seiner Ehefrau Maria, geb. Schwarzott, in Görlitz/Schlesien geboren.

In Porz bei Köln besuchte ich die Volksschule, anschließend in Berlin die Riemeisterschule und das Schadow-Gymnasium.

1964 legte ich am Neuen Realgymnasium in München das Abitur ab.

Universitätsstudium:

1964 - 1969 Studium der Lebensmittelchemie an der
Universität München.

Vorexamen: Oktober 1967

Staatsexamen: Juli 1969

Im Oktober 1969 begann ich die Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München.

Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

